

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> : C12N 15/82, 9/26, 15/54, A01H 5/00, C08B 30/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/08185 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. Februar 2000 (17.02.00)
--	----	---

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/05523  
(22) Internationales Anmeldedatum: 30. Juli 1999 (30.07.99)  
(30) Prioritätsdaten:  
198 36 099.1 31. Juli 1998 (31.07.98) DE  
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):  
HOECHST SCHERING AGREVO GMBH [DE/DE];  
Mirastrasse 54, D-13509 Berlin (DE).  
(72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FROHBURG, Claus  
[DE/DE]; Blankenhainer Strasse 17, D-12249 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

#### Veröffentlicht

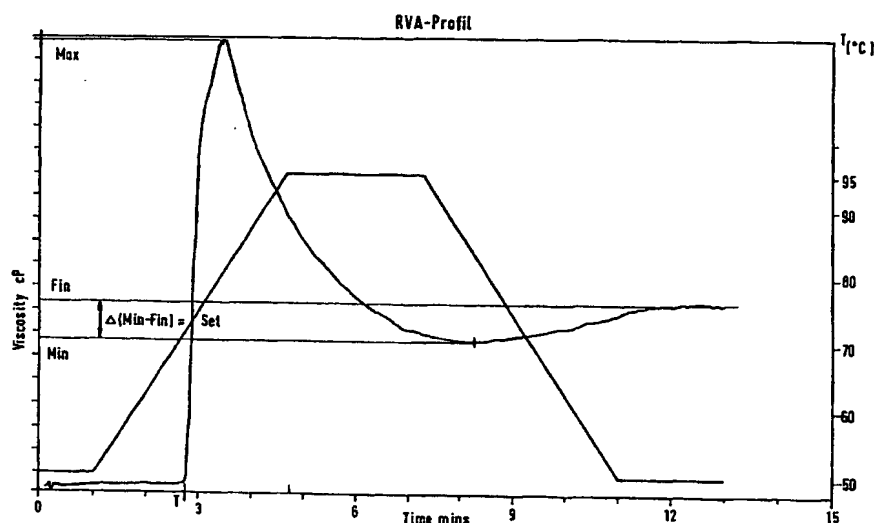
Mit internationalem Recherchenbericht.  
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: NUCLEIC ACID MOLECULE CODING FOR BETA-AMYLASE, PLANTS SYNTHESIZING A MODIFIED STARCH, METHOD OF PRODUCTION AND APPLICATIONS

(54) Bezeichnung: NUKLEINSÄUREMOLEKÜLE KODIEREND FÜR BETA-AMYLASE, PFLANZEN, DIE EINE MODIFIZIERTE STÄRKE SYNTHETISIEREN, HERSTELLUNGSVERFAHREN UND VERWENDUNGEN

#### (57) Abstract

The present invention relates to nucleic acid molecules coding for a protein with beta-amylase activity from potato and to a method for the production of transgenic plant cells and plants synthesizing a modified starch. The invention also relates to vectors and host cells containing the nucleic acid molecules according to the invention, the plant cells and plants produced using the method according to the invention and the starch synthesized by the plant cells and plants according to the invention. The invention also relates to a method of production of said starch.



**(57) Zusammenfassung**

Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuremoleküle, die ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Amylase aus Kartoffel kodieren sowie Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzenzellen und Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung Vektoren und Wirtszellen, welche die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle enthalten, die aus den erfindungsgemäßen Verfahren hervorgehenden Pflanzenzellen und Pflanzen, die von den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierte Stärke sowie Verfahren zur Herstellung dieser Stärke.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

NUKLEINSÄUREMOLEKÜLE KODIEREND FÜR BETA-AMYLASE, PFLANZEN, DIE EINE MODIFIZIERTE STÄRKE SYNTHETISIEREN, HERSTELLUNGSVERFAHREN UND VERWENDUNGEN

Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuremoleküle, die ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Amylase aus Kartoffel kodieren sowie Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzenzellen und Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren. Desweiteren betrifft die vorliegende Erfindung Vektoren und Wirtszellen, welche die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle enthalten, die aus den erfindungsgemäßen Verfahren hervorgehenden Pflanzenzellen und Pflanzen, die von den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierte Stärke sowie Verfahren zur Herstellung dieser Stärke.

Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung, die pflanzlichen Inhaltsstoffen als erneuerbaren Rohstoffquellen beigemessen wird, ist die biotechnologische Forschung um eine Anpassung pflanzlicher Rohstoffe an die Anforderungen der verarbeitenden Industrie bemüht. Um die Anwendung von nachwachsenden Rohstoffen in möglichst vielen Einsatzgebieten zu ermöglichen, ist es insofern erforderlich, eine große Stoffvielfalt zur Verfügung zu stellen.

Neben Ölen, Fetten und Proteinen stellen Polysaccharide wichtige, nachwachsende Rohstoffe aus Pflanzen dar. Eine zentrale Stellung bei den Polysacchariden nimmt neben Cellulose die Stärke ein, die einer der wichtigsten Speicherstoffe in höheren Pflanzen ist. Neben Mais, Reis und Weizen spielt die Kartoffel insbesondere bei der Stärkeproduktion eine wichtige Rolle.

Das Polysaccharid Stärke ist ein Polymer aus chemisch einheitlichen Grundbausteinen, den Glukosemolekülen. Es handelt sich dabei jedoch um ein sehr komplexes Gemisch aus unterschiedlichen Molekülformen, die sich hinsichtlich ihres Polymerisationsgrades

B E S T Ä T I G U N G S K O P I E

und des Auftretens von Verzweigungen der Glukoseketten unterscheiden. Daher stellt Stärke keinen einheitlichen Rohstoff dar. Man unterscheidet insbesondere die Amylose-„Stärke, ein im wesentlichen unverzweigtes“ Polymer aus  $\alpha$ -1,4-glykosidisch verknüpften Glukosemolekülen, von der Amylopektin-Stärke, die ihrerseits ein komplexes Gemisch aus unterschiedlich verzweigten Glukoseketten darstellt. Die Verzweigungen kommen dabei durch das Auftreten von zusätzlichen  $\alpha$ -1,6-glykosidischen Verknüpfungen zustande. In typischen für die Stärkeproduktion verwendeten Pflanzen, wie z.B. Mais oder Kartoffel, besteht die synthetisierte Stärke zu ca. 25% aus Amylosestärke und zu ca. 75% aus Amylopektin-Stärke.

Die molekulare Struktur der Stärke, die zu einem großen Teil durch den Verzweigungsgrad, das Amylose/Amylopektin-Verhältnis, die durchschnittliche Länge und Verteilung der Seitenketten sowie das Vorhandensein von Phosphatgruppen bestimmt wird, ist ausschlaggebend für wichtige funktionelle Eigenschaften der Stärke bzw. ihrer wäßrigen Lösungen. Als wichtige funktionelle Eigenschaften sind hierbei beispielsweise zu nennen, die Löslichkeit, das Retrogradierungsverhalten, die Filmbildungseigenschaften, die Viskosität, die Farbstabilität, die Verkleisterungseigenschaften sowie Binde- und Klebeeigenschaften. Auch die Stärkekorngröße kann für verschiedene Anwendungen von Bedeutung sein. Für bestimmte Anwendungen ist auch die Erzeugung von hochamylosehaltigen Stärken von besonderem Interesse. Ferner kann eine in Pflanzenzellen enthaltene modifizierte Stärke das Verhalten der Pflanzenzelle unter bestimmten Bedingungen vorteilhaft verändern. Denkbar ist beispielsweise eine Verringerung des Stärkeabbaus während der Lagerung von Stärke-enthaltenden Organen, wie z.B. Samen oder Knollen, vor deren weiterer Verarbeitung, z.B. zur Extraktion der Stärke. Ferner ist es von Interesse, modifizierte Stärken herzustellen, die dazu führen, daß Pflanzenzellen oder pflanzliche Organe, die diese Stärke enthalten, besser zur Weiterverarbeitung geeignet sind, beispielsweise bei der Herstellung von Lebensmitteln wie „Popcorn“ oder „Cornflakes“ aus Mais oder von Pommes frites, Chips oder Kartoffelpulver aus Kartoffeln. Von besonderem Interesse ist hierbei die Verbesserung der Stärken in der Hinsicht, daß sie ein reduziertes „cold sweetening“ aufweisen, d.h. eine verringerte Freisetzung von reduzierenden Zuckern

(insbesondere Glucose) bei einer längeren Lagerung bei niedrigen Temperaturen. Gerade Kartoffeln werden häufig bei Temperaturen von 4 bis 8°C gelagert, um den Stärkeabbau während der Lagerung zu minimieren. Die hierbei freigesetzten reduzierenden Zucker, insbesondere Glucose, führen beispielsweise bei der Herstellung von Pommes frites oder Chips zu unerwünschten Bräunungsreaktionen (sogenannte Maillard-Reaktionen).

Die Anpassung der aus Pflanzen isolierbaren Stärke an bestimmte industrielle Verwendungszwecke erfolgt häufig mit Hilfe chemischer Modifikationen, die in der Regel zeit- und kostenintensiv sind. Es erscheint daher wünschenswert, Möglichkeiten zu finden, Pflanzen herzustellen, die eine Stärke synthetisieren, die in ihren Eigenschaften bereits den spezifischen Anforderungen der verarbeitenden Industrie entsprechen und somit ökonomische und ökologische Vorteile in sich vereinen.

Eine Möglichkeit, derartige Pflanzen bereitzustellen, besteht - neben züchterischen Maßnahmen - in der gezielten genetischen Veränderung des Stärkemetabolismus stärkeproduzierender Pflanzen durch gentechnologische Methoden. Voraussetzung hierfür ist jedoch die Identifizierung und Charakterisierung der an der Stärkesynthese - modifikation und -abbau (Stärkemetabolismus) beteiligten Enzyme sowie die Isolierung der entsprechenden, für diese Enzyme kodierenden DNA-Sequenzen.

Die biochemischen Synthesewege, die zum Aufbau von Stärke führen, sind im wesentlichen bekannt. Die Stärkesynthese in pflanzlichen Zellen findet in den Plastiden statt. In photosynthetisch aktiven Geweben sind dies die Chloroplasten, in photosynthetisch inaktiven, stärke-speichernden Geweben die Amyloplasten.

Wichtige am Stärkemetabolismus beteiligte Enzyme sind z.B. die Verzweigungsenzyme (branching enzyme), ADP-Glukose-Pyrophosphorylasen, Stärke-korn-gebundene Stärkesynthasen, lösliche Stärkesynthasen, Entzweigungsenzyme (debranching enzyme), Disproportionierungsenzyme, plastidäre Stärkephosphorylasen, die R1- Enzyme (R1-Proteine), Amylasen oder Glukosidasen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, weitere bzw. alternative gentechnische Ansätze zur Modifizierung des Stärkemetabolismus in stärkebildenden Pflanzen (z.B. Roggen, Gerste, Hafer, Mais, Weizen, Hirse, Sago, Reis, Erbse, Markerbse, Maniok, Kartoffel, Tomate, Raps, Sojabohne, Hanf, Flachs, Sonnenblume, Kuherbse, Mungbohne, Bohne, Banane oder Arrowroot) geeignete Nukleinsäuremoleküle zur Verfügung zu stellen, mittels derer Pflanzenzellen transformiert werden können, so daß die Synthese von veränderten, vorteilhaften Stärkevarietäten ermöglicht wird.

Solche veränderten Stärkevarietäten weisen z.B. Modifikationen in bezug auf ihren Verzweigungsgrad, das Amylose/Amylopektin-Verhältnis, den Phosphatgehalt, die Stärkekorngröße und/oder die durchschnittliche Länge und Verteilung der Seitenketten (d.h. Seitenkettenstruktur) auf.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, Verfahren zur Verfügung zu stellen, die die Herstellung transgener Pflanzen ermöglichen, die eine veränderte Stärkevarietät synthetisieren.

Überraschenderweise synthetisieren transgene Pflanzen, die mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen transformiert wurden, eine Stärke, die in besonderer Weise in ihren physikochemischen Eigenschaften und/oder in ihrer Seitenkettenstruktur verändert ist, so daß die genannten Aufgaben durch die Bereitstellung der in den Ansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst werden.

Gegenstand der Erfindung ist daher ein Nukleinsäuremolekül, codierend für ein Protein mit der Funktion einer  $\beta$ -Amylase aus Kartoffel, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus a) Nukleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die unter Seq ID NO. 2 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt oder deren Derivate oder Teile, b) Nukleinsäuremolekülen, die die unter Seq ID No. 1 dargestellte Nucleotidsequenz oder deren Derivate oder Teile umfassen oder eine korrespondierende Ribonucleotidsequenz; c) Nukleinsäuremoleküle, die mit den unter (a) oder (b) genannten Nukleinsäuremolekülen hybridisieren oder komplementär sind, vorzugsweise spezifisch hybridisieren und

d) Nukleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter (a), (b) oder (c) genannten Nukleinsäuremoleküle abweicht.

Entsprechend betrifft die vorliegende Erfindung ein für eine  $\beta$ -Amylase codierendes Nukleinsäuremolekül, das eine Aminosäuresequenz gemäß Seq. ID Nr. 2 oder deren Derivate oder Teile davon gemäß dem cDNA-Insert des Plasmids St-b-Amy (DSM Nr. 12348) codiert, enthält. Die genannte erfindungsgemäße  $\beta$ -Amylase ist am Stärkestoffwechsel der Kartoffel beteiligt und ist direkt oder indirekt an der Stärkebiosynthese beteiligt.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung umfaßt der Begriff "Derivat" in bezug auf das  $\beta$ -Amylase-Protein (bzw. dessen Polypeptid, Aminosäuresequenz) der Erfindung ein von Seq. ID Nr. 2 abgeleitetes Polypeptid, das mindestens 86 Aminosäurereste, vorzugsweise mindestens 120, insbesondere mindestens 155 und ganz besonders bevorzugt etwa 163-170 Aminosäurereste enthält, die aus der Gruppe der Aminosäurereste bestehend aus 112 V, 113 P, 114 V, 116 V, 117 M, 119 P, 120 L, 139 L, 142 L, 145 A, 146 G, 147 V, 149 G, 151 M, 153 D, 155 W, 156 W, 157 G, 160 E, 164 P, 167 Y, 169 W, 172 Y, 175 L, 183 G, 184 L, 185 K, 187 Q, 190 M, 191 S, 192 F, 193 H, 195 C, 196 G, 197 G, 198 N, 199 V, 200 G, 201 D, 205 I, 206 P, 208 P, 210 W, 211 V, 219 P, 220 D, 223 Y, 224 T, 228 G, 230 R, 231 N, 233 E, 234 Y, 238 G, 240 D, 243 P, 247 G, 248 R, 249 T, 254 Y, 256 D, 258 M, 261 F, 262 R, 273 I, 276 I, 278 V, 279 G, 281 G, 282 P, 284 G, 285 E, 286 L, 287 R, 288 Y, 289 P, 290 S, 291 Y, 292 P, 298 W, 300 F, 301 P, 302 G, 303 I, 304 G, 306 F, 307 Q, 308 C, 309 Y, 310 D, 311 K, 312 Y, 321 A, 325 G, 329 W, 336 D, 337 A, 338 G, 340 Y, 344 P, 347 T, 349 F, 350 F, 362 G, 364 F, 365 F, 368 W, 369 Y, 370 S, 373 L, 376 H, 380 I, 381 L, 384 A, 388 F, 393 V, 394 K, 398 K, 401 G, 402 I, 403 H, 404 W, 406 Y, 411 H, 412 A, 414 E, 415 L, 416 T, 417 A, 418 G, 419 Y, 420 Y, 421 N, 426 D, 427 G, 428 Y, 430 P, 431 I, 432 A, 438 H, 443 N, 444 F, 445 T, 446 C, 448 E, 449 M, 453 E, 454 Q, 458 A, 462 P, 465 L,

466 V, 468 Q, 469 V, 481 A, 483 E, 484 N, 485 A, 486 L, 488 R, 489 Y, 490 D, 493 A, 496 Q, 518 T, 519 Y, 520 L, 521 R, 526 L, 538 F, 539 V und 542 M gemäß Seq. ID Nr. 2 ausgewählt sind, und das mindestens etwa 1-61, vorzugsweise mindestens 122, insbesondere mindestens 170, bevorzugter mindestens 220 und ganz besonders bevorzugt etwa 232-241 Aminosäurereste enthält, die aus der Gruppe der Aminosäurereste bestehend aus 1 M, 2 A, 3 M, 4 S, 5 L, 6 P, 7 H, 8 Q, 9 I, 10 G, 11 A, 12 L, 13 S, 14 G, 15 T, 16 S, 17 L, 18 T, 19 A, 20 E, 21 T, 22 G, 23 G, 24 V, 25 S, 26 C, 27 E, 28 V, 29 P, 30 A, 31 K, 32 G, 33 S, 34 S, 35 A, 36 T, 38 A, 39 M, 40 W, 41 R, 42 T, 44 M, 45 T, 46 N, 47 L, 48 K, 49 V, 50 S, 51 V, 52 Q, 53 K, 54 T, 55 G, 56 T, 57 E, 58 I, 59 D, 60 R, 61 V, 62 S, 63 P, 64 S, 65 P, 66 S, 67 P, 68 P, 69 M, 70 S, 71 P, 73 M, 74 G, 75 G, 76 G, 78 R, 79 P, 80 D, 81 L, 82 L, 84 C, 85 Q, 86 A, 87 L, 88 M, 89 E, 90 A, 91 Q, 92 V, 93 D, 94 E, 95 V, 96 V, 97 E, 98 R, 99 E, 100 Y, 101 K, 103 R, 105 S, 107 E, 108 K, 109 E, 110 K, 111 G, 118 M, 122 S, 124 K, 126 D, 127 H, 128 T, 131 R, 132 K, 133 K, 140 Q, 144 S, 152 M, 161 R, 163 A, 170 G, 176 M, 177 E, 180 K, 186 V, 204 T, 209 R, 212 V, 215 M, 222 A, 226 Q, 227 W, 232 F, 235 V, 241 T, 242 L, 246 K, 251 V, 253 C, 260 G, 263 D, 267 N, 271 D, 272 T, 294 K, 295 D, 297 V, 299 K, 305 A, 314 I, 319 G, 323 A, 324 F, 331 H, 332 T, 335 T, 339 Q, 343 W, 348 N, 352 K, 353 E, 355 G, 356 G, 358 D, 360 Q, 363 E, 371 E, 372 M, 378 E, 382 Q, 383 S, 385 K, 386 A, 387 I, 389 E, 390 D, 391 K, 392 G, 395 I, 397 V, 399 I, 407 G, 413 P, 433 Q, 442 F, 447 V, 452 H, 456 Q, 459 L, 467 R, 470 A, 471 L, 474 Q, 475 E, 477 Q, 478 V, 479 P, 491 D, 492 Y, 494 H, 495 E, 499 Q, 500 A, 501 S, 502 S, 503 L, 505 I, 506 N, 508 Q, 509 S, 511 D, 513 E, 515 C, 524 P, 528 H, 529 P, 530 D, 534 R, 537 A, 546 K, 548 A, 549 N, 550 K, 551 C, 552 R, 555 V, 556 E, 558 E, 559 A, 560 E, 561 H, 562 F, 564 H, 565 I, 566 T, 567 Q, 568 P, 569 L, 570 V, 571 Q, 573 A, 574 A, 575 A, 576 A, 577 L, 578 M und 579 H (hier durch Einbuchstabencode für Aminosäuren angegeben) gemäß Seq. ID Nr. 2 ausgewählt sind.



Im Sinne der vorliegenden Erfindung umfaßt der Begriff "Teil" in bezug auf das erfindungsgemäße  $\beta$ -Amylase-Protein (Polypeptid, Aminosäuresequenz) ein Poly- oder Oligopeptid, bestehend aus mindestens etwa 10-19, vorzugsweise mindestens 80, bevorzugter mindestens 160, besonders bevorzugt mindestens 320 und am meisten bevorzugt etwa 400-550 der Aminosäurereste der durch das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül codierten  $\beta$ -Amylase oder deren Derivate.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Nukleinsäuremolekül, das ein Nukleinsäuremolekül gemäß Seq. ID Nr. 1 enthält, gemäß dem cDNA-Insert des bei der DSZM am 24.07.1998 hinterlegten Plasmids DSM Nr. 12348 oder dessen Derivate oder Teile, insbesondere der codierenden Region oder deren Derivate oder Teile.

Im Sinne dieser Erfindung umfaßt der Begriff "Derivat" in bezug auf das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül (Nucleotidsequenz oder Polynucleotid) ein Polynucleotid, das mindestens 246 Nucleotide, vorzugsweise mindestens 344, insbesondere mindestens 443, und ganz besonders bevorzugt etwa 467-487 Nucleotide enthält, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 241 T, 245 T, 257 C, 268 G, 272 A, 279 T, 285 A, 290 A, 291 G, 307 A, 309 G, 311 A, 314 C, 320 A, 322 A, 323 A, 325 G, 334 G, 335 T, 337 C, 338 C, 340 G, 341 T, 343 T, 346 G, 347 T, 349 A, 350 T, 351 G, 353 T, 355 C, 356 C, 359 T, 361 G, 368 T, 370 A, 386 T, 400 G, 404 T, 406 A, 409 G, 416 T, 420 G, 425 T, 433 G, 434 C, 436 G, 437 G, 439 G, 440 T, 442 G, 443 A, 445 G, 446 G, 449 T, 451 A, 452 T, 453 G, 457 G, 458 A, 460 G, 463 T, 464 G, 465 G, 466 T, 467 G, 468 G, 469 G, 470 G, 473 T, 476 T, 478 G, 479 A, 487 G, 490 C, 491 C, 499 T, 500 A, 503 A, 505 T, 506 G, 507 G, 511 G, 514 T, 515 A, 524 T, 527 T, 533 T, 535 G, 539 A, 542 A, 547 G, 548 G, 551 T, 553 A, 554 A, 557 T, 559 C, 560 A, 562 G, 566 T, 568 A, 569 T, 570 G, 571 T, 572 C, 574 T, 575 T, 576 C, 577 C, 578 A, 583 T, 584 G, 586 G, 587 G, 589 G, 590 G, 592 A, 593 A, 595 G, 596 T, 598 G, 599 G, 601 G, 602 A, 610 A, 613 A, 614 T, 615 C, 616 C, 617 C, 620 T, 622 C, 623 C, 628 T,

629 G, 630 G, 631 G, 632 T, 637 G, 638 A, 653 A, 655 C, 656 C, 658 G, 659 A, 662 T, 667 T, 668 A, 669 C, 670 A, 671 C, 682 G, 683 G, 689 G, 690 G, 691 A, 692 A, 697 G, 698 A, 700 T, 701 A, 704 T, 710 T, 712 G, 713 G, 718 G, 719 A, 727 C, 728 C, 731 T, 734 T, 739 G, 740 G, 742 A, 743 G, 745 A, 746 C, 749 C, 752 T, 755 A, 760 T, 761 A, 766 G, 767 A, 768 T, 769 T, 771 C, 772 A, 773 T, 774 G, 779 G, 781 T, 782 T, 785 G, 787 G, 788 A, 794 T, 806 T, 811 G, 817 A, 818 T, 823 G, 824 A, 826 A, 827 T, 830 A, 832 G, 833 T, 835 G, 836 G, 839 T, 841 G, 842 G, 844 C, 845 C, 850 G, 851 G, 853 G, 854 A, 857 T, 860 G, 862 T, 863 A, 865 C, 866 C, 868 T, 869 C, 871 T, 872 A, 874 C, 875 C, 878 A, 880 A, 884 A, 886 G, 887 G, 892 T, 893 G, 894 G, 898 T, 899 T, 901 C, 902 C, 904 G, 905 G, 907 A, 908 T, 910 G, 911 G, 916 T, 917 T, 919 C, 920 A, 922 T, 923 G, 925 T, 926 A, 928 G, 929 A, 930 C, 931 A, 932 A, 934 T, 935 A, 938 T, 949 T, 950 T, 961 G, 962 C, 973 G, 974 G, 977 A, 980 C, 983 A, 985 T, 986 G, 987 G, 988 G, 1000 C, 1001 C, 1006 G, 1007 A, 1009 G, 1010 C, 1012 G, 1013 G, 1018 T, 1019 A, 1020 C, 1021 A, 1022 A, 1025 A, 1030 C, 1031 C, 1033 G, 1034 A, 1039 A, 1040 C, 1045 T, 1046 T, 1048 T, 1049 T, 1050 C, 1051 A, 1060 G, 1069 T, 1075 A, 1079 A, 1082 A, 1084 G, 1085 G, 1090 T, 1091 T, 1093 T, 1094 T, 1095 C, 1097 T, 1102 T, 1103 G, 1104 G, 1105 T, 1106 A, 1108 T, 1109 C, 1118 T, 1121 T, 1124 A, 1126 C, 1127 A, 1130 G, 1139 T, 1187 C, 1192 A, 1193 A, 1196 T, 1199 C, 1201 G, 1202 G, 1204 A, 1205 T, 1207 C, 1208 A, 1209 C, 1210 T, 1211 G, 1212 G, 1216 T, 1217 A, 1227 G, 1231 C, 1232 A, 1234 G, 1235 C, 1238 C, 1240 G, 1241 A, 1243 C, 1244 T, 1246 A, 1247 C, 1249 G, 1250 C, 1252 G, 1253 G, 1255 T, 1256 A, 1258 T, 1259 A, 1260 C, 1261 A, 1262 A, 1263 C, 1276 G, 1277 A, 1279 G, 1280 G, 1282 T, 1283 A, 1285 C, 1288 C, 1289 C, 1291 A, 1292 T, 1294 G, 1295 C, 1300 A, 1301 T, 1304 T, 1312 C, 1313 A, 1318 G, 1322 T, 1325 T, 1327 A, 1328 A, 1330 T, 1331 T, 1333 A, 1334 C, 1336 T, 1337 G, 1342 G, 1343 A, 1344 G, 1345 A, 1346 T, 1347 G, 1352 A, 1353 C, 1357 G, 1358 A, 1360 C, 1361 A, 1370 A, 1372 G, 1373 C, 1379 G, 1382 C, 1384 C, 1385 C, 1388 A, 1394 T, 1396 G, 1397 T, 1401 G, 1402 C, 1403 A, 1405 G, 1406 T, 1414 G, 1422 G, 1426 G, 1439 T, 1441 G,

1442 C, 1445 G, 1447 G, 1448 A, 1450 A, 1451 A, 1453 G, 1454 C, 1457 T, 1463 G, 1465 T, 1466 A, 1468 G, 1469 A, 1477 G, 1478 C, 1481 A, 1490 T, 1511 A, 1520 A, 1541 T, 1546 G, 1550 T, 1552 A, 1553 C, 1555 T, 1556 A, 1559 T, 1562 G, 1565 T, 1577 T, 1580 T, 1591 A, 1592 A, 1594 T, 1603 T, 1604 T, 1612 T, 1613 T, 1615 G, 1616 T, 1621 A, 1622 A, 1624 A, 1625 T, 1626 G, 1628 A, 1630 G, 1633 G, 1640 A, 1661 A, 1683 T, 1692 T, 1713 A, 1719 T, 1728 C und 1731 C gemäß Seq. ID Nr. 1

und das ferner mindestens etwa 1-127 Nucleotide, vorzugsweise mindestens 253, insbesondere mindestens 354, bevorzugter mindestens 455 und ganz besonders bevorzugt etwa 481-501 Nucleotide enthält, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus 1 A, 2 T, 3 G, 4 G, 5 C, 6 A, 7 A, 8 T, 9 G, 10 A, 11 G, 12 T, 13 C, 14 T, 15 G, 16 C, 17 C, 18 A, 19 C, 20 A, 21 C, 22 C, 23 A, 24 G, 25 A, 26 T, 27 C, 28 G, 29 G, 30 T, 31 G, 32 C, 33 C, 34 T, 35 T, 36 A, 37 T, 38 C, 39 A, 40 G, 41 G, 42 A, 43 A, 44 C, 45 A, 46 T, 47 C, 48 G, 49 C, 50 T, 51 C, 52 A, 53 C, 54 G, 55 G, 56 C, 57 G, 58 G, 59 A, 60 A, 61 A, 62 C, 63 C, 64 G, 65 G, 66 T, 67 G, 68 G, 69 A, 70 G, 71 T, 72 T, 73 T, 74 C, 75 A, 76 T, 77 G, 78 C, 79 G, 80 A, 81 A, 82 G, 83 T, 84 T, 85 C, 86 C, 87 G, 88 G, 89 C, 90 G, 92 A, 93 G, 94 G, 95 G, 96 G, 97 A, 99 T, 102 A, 103 G, 104 C, 105 T, 106 A, 109 T, 110 C, 111 A, 112 G, 113 C, 115 A, 116 T, 117 G, 118 T, 120 G, 121 A, 122 G, 123 A, 124 A, 125 C, 126 A, 127 C, 129 G, 131 T, 132 G, 133 A, 134 C, 135 G, 137 A, 138 T, 139 T, 140 T, 141 A, 142 A, 143 A, 144 A, 146 T, 148 T, 149 C, 150 G, 152 T, 153 A, 154 C, 155 A, 157 A, 160 A, 161 C, 162 A, 163 G, 165 A, 166 A, 167 C, 169 G, 171 A, 172 A, 174 T, 175 G, 176 A, 178 A, 179 G, 180 G, 181 G, 183 G, 184 T, 185 C, 188 C, 189 G, 190 T, 191 C, 195 G, 196 T, 199 C, 200 C, 201 G, 202 C, 203 C, 204 G, 205 A, 206 T, 207 G, 208 A, 209 G, 210 T, 211 C, 216 G, 217 A, 218 T, 226 G, 228 A, 229 A, 231 G, 233 G, 234 G, 237 G, 238 G, 239 A, 244 T, 246 A, 247 G, 250 T, 252 T, 254 A, 256 G, 260 T, 262 A, 263 T, 274 G, 275 T, 276 A, 277 G, 278 A, 284 T, 286 G, 287 T, 288 T, 293 G, 295 G, 297 A, 298 T, 301 A, 302 A, 304 G, 306 T, 308 G, 310 A, 313 T, 315 G, 324 A, 327 G, 328 A, 331 G, 333 A, 348 T, 352 A, 354 G, 358 T, 360 G, 363 T, 365 G, 369 G, 379 C, 383 C,

392 G, 393 G, 394 A, 395 A, 396 G, 397 A, 402 G, 408 T, 417 A, 419 A, 424 T, 430 A, 432 C, 447 G, 488 C, 495 A, 519 T, 528 G, 529 G, 538 A, 549 A, 556 G, 558 T, 567 G, 573 T, 588 T, 600 T, 611 C, 612 G, 618 T, 619 C, 621 T, 626 G, 633 T, 634 G, 639 G, 645 G, 657 A, 665 C, 666 A, 678 G, 681 G, 684 A, 687 G, 693 T, 694 T, 695 T, 703 G, 705 A, 708 G, 709 C, 717 C, 723 A, 726 T, 729 A, 732 T, 744 G, 747 T, 751 G, 756 A, 757 T, 758 G, 762 T, 777 A, 778 G, 780 G, 783 T, 789 T, 799 A, 805 C, 814 A, 815 C, 816 C, 859 C, 861 T, 864 T, 879 A, 882 A, 883 G, 885 T, 889 G, 890 T, 891 A, 912 T, 914 C, 915 T, 941 T, 942 C, 943 A, 951 A, 952 C, 956 G, 966 A, 970 T, 978 G, 992 A, 995 C, 996 C, 999 T, 1003 A, 1004 C, 1014 T, 1015 C, 1026 T, 1027 T, 1028 G, 1029 G, 1042 A, 1055 A, 1062 T, 1065 T, 1066 G, 1067 G, 1072 G, 1078 C, 1080 A, 1087 G, 1098 C, 1115 T, 1119 T, 1120 T, 1134 G, 1144 C, 1146 A, 1147 T, 1148 C, 1155 G, 1156 G, 1157 C, 1159 A, 1161 A, 1165 G, 1166 A, 1169 A, 1171 A, 1172 A, 1173 G, 1174 G, 1175 G, 1179 T, 1183 A, 1186 T, 1191 T, 1195 A, 1197 T, 1200 A, 1203 T, 1219 G, 1224 A, 1233 T, 1237 C, 1245 G, 1267 C, 1281 T, 1296 C, 1305 T, 1311 C, 1320 A, 1350 T, 1354 C, 1355 A, 1356 C, 1365 A, 1366 C, 1368 A, 1377 A, 1386 T, 1393 T, 1400 G, 1408 G, 1409 C, 1410 T, 1411 T, 1412 T, 1413 A, 1420 C, 1421 A, 1423 G, 1428 T, 1429 C, 1432 G, 1435 C, 1436 C, 1456 T, 1472 A, 1474 T, 1476 T, 1479 A, 1483 G, 1485 A, 1494 T, 1499 C, 1500 A, 1501 T, 1503 C, 1504 T, 1507 T, 1508 T, 1509 G, 1514 T, 1516 A, 1517 A, 1525 T, 1526 C, 1527 A, 1528 G, 1529 G, 1533 T, 1536 A, 1538 A, 1544 G, 1557 T, 1558 T, 1560 G, 1569 T, 1570 C, 1571 C, 1575 C, 1581 C, 1582 C, 1584 T, 1585 C, 1588 G, 1590 T, 1593 C, 1597 A, 1601 G, 1608 T, 1629 A, 1635 A, 1636 A, 1638 A, 1641 C, 1643 C, 1644 A, 1646 A, 1647 C, 1649 A, 1651 T, 1652 G, 1655 G, 1664 T, 1666 G, 1668 G, 1674 G, 1676 C, 1678 G, 1680 G, 1682 A, 1686 C, 1687 G, 1690 C, 1693 A, 1696 A, 1698 T, 1708 G, 1712 A, 1724 C, 1725 T, 1727 C, 1729 C, 1730 T, 1732 A, 1734 G, 1735 C, 1736 A und 1738 T gemäß Seq. ID Nr. 1.

Bei der oben explizit angegebenen Numerierung der Positionen der einzelnen Elemente

der erfindungsgemäßen Nukleotid- bzw. Aminosäure-Sequenzen gemäß Seq ID Nr. 1 bzw. Seq. ID Nr. 2 werden als Derivate der besagten erfindungsgemäßen Sequenzen auch solche Sequenzen verstanden, in denen die Numerierung der einzelnen Sequenzelemente von denen der erfindungsgemäßen Sequenzen ID Nr. 1 bzw. Nr. 2 abweichen kann. Maßgebend ist hierbei eine signifikante Übereinstimmung von mindestens einem Sequenzabschnitt ("Teil") mit der erfindungsgemäßen Sequenz. Solche Übereinstimmungen können gemäß dem allgemeinen Fachwissen z.B. durch geeignete Computer-Programme einfach ermittelt werden, indem z.B. ein Sequenzvergleich der erfindungsgemäßen Sequenz mit einer in Frage stehenden, zu vergleichenden Sequenz durchgeführt wird (sog. "Sequenz-Alignment"). Derartige Computer-Programme, die z.B. käuflich zu erwerben sind (z.B. Omega<sup>®</sup>, Version 1.1.3. der Firma Oxford Molecular Ltd., Oxford, UK) und die zum Teil auch integraler Bestandteil von Sequenzdatenbanken (z.B. EMBL, GenBank) sind, identifizieren z.B. die bestmögliche Übereinstimmung von identischen bzw. gegebenenfalls chemisch äquivalenten Sequenzelementen und berücksichtigen insbesondere das Vorliegen von Insertionen und/oder Deletionen, die zu einer Verschiebung einzelner Sequenzelemente oder von Sequenzabschnitten führen können und auf diese Weise die Numerierung der Sequenzelemente oder Sequenzabschnitte beeinflussen können.

Ferner umfaßt der Begriff "Derivat" in bezug auf das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül, das für eine  $\beta$ -Amylase codiert, ein Nukleinsäuremolekül, das durch Addition, Deletion, Insertion oder Rekombination eines oder mehrerer Nucleotide von Seq. ID Nr. 1 abweicht und die Bedingungen wie oben definiert erfüllt.

Außerdem beinhaltet der Begriff "Derivat" in bezug auf das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül, das für eine  $\beta$ -Amylase codiert, eine komplementäre oder eine revers komplementäre Sequenz (Polynucleotid) des erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls oder von Derivaten oder Teilen davon.

Der Begriff "Teil", der sich auf das für eine  $\beta$ -Amylase codierende Nukleinsäuremolekül gemäß dieser Erfindung bezieht, umfaßt ein Poly- oder Oligonucleotid, bestehend aus mindestens etwa 15-35, vorzugsweise mindestens etwa 36-100, insbesondere mindestens 200, bevorzugter mindestens 400, besonders bevorzugt mindestens 800 und am meisten bevorzugt etwa 1400-1700 der Nucleotide eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls, das für eine  $\beta$ -Amylase codiert, oder deren Derivate.

In einer bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung umfassen die Begriffe "Derivat" und/oder "Teil" gemäß der vorliegenden Erfindung ein Polynucleotid, bzw. ein wie oben definiertes Poly- oder Oligopeptid, das eine funktionale und/oder strukturelle Äquivalenz des aus Kartoffel gewonnenen  $\beta$ -Amylase-Gens (d.h. des Nukleinsäuremoleküls, das für die  $\beta$ -Amylase codiert) bzw.  $\beta$ -Amylase-Polypeptids zeigt. Der Begriff "funktionale und/oder strukturelle Äquivalenz" bedeutet im allgemeinen die gleiche, eine äquivalente oder ähnliche Funktion des entsprechenden Moleküls der Erfindung, gegebenenfalls insbesondere biologische Funktion.

Ein weiterer Erfindungsgegenstand ist ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül, enthaltend a) eine Nukleotidsequenz codierend für ein Protein mit der Funktion einer  $\beta$ -Amylase, vorzugsweise aus Kartoffel, oder Teile besagter Nukleotidsequenz und b) ein oder mehrere Nukleotidsequenzen, die für ein Protein kodieren, ausgewählt aus der Gruppe A, bestehend aus Proteinen mit der Funktion von Verzweigungsenzymen, ADP-Glukose-Pyrophosphorylasen, Stärkekorn-gebundenen Stärkesynthasen, löslichen Stärkesynthasen, Entzweigungsenzymen, Disproportionierungsenzymen, plastidären Stärkephosphorylasen, R1- Enzymen, Amylasen, Glukosidasen, Teilen von Nukleotidsequenzen kodierend für Proteine ausgewählt aus der Gruppe A und Nukleinsäuremoleküle, die mit einem der besagten Nukleotidsequenzen oder deren Teilen hybridisiert, vorzugsweise ein Desoxyribonukleinsäure- oder Ribonukleinsäure-Molekül, besonders bevorzugt ein cDNA-Molekül. Besonders bevorzugt ist ein Nukleinsäuremolekül, das mit einem der besagten Nukleotidsequenzen oder deren

Teilen spezifisch hybridisiert.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure codierend für ein Protein mit der Funktion einer  $\beta$ -Amylase aus Kartoffel ist durch Seq. ID Nr. 1 dargestellt, das durch die Nukleotidsequenz kodierte Protein durch Seq. ID Nr. 2.

Seq. ID Nr. 1:

attaatattattattatggcaatgagctgccacaccagatcggcgcttatcaggaaca  
tcgctcacggcggaaccgggtggagttcatgcaagttccggcgaaggggagttcagct  
acatcagctatgtggagaacaccgatgacgaattaaaagtatcggtaaaaaacagga  
actgaaattgacaggggtgctgccgctgccgctgccgcccgatgagtcgatgatgggagga  
ggaatcgggccggatttattagcgtgtcaagcgttgatggaagctcaggtagatgaggta  
gttgagagagaatataagggttaggaattcgtcggagaaaagagaaaggagttccgggtgtt  
gttatgatgccgttgatagtgtaaaatggatcatactgtgaataggaagaaggcgatg  
aatcgaggttacaggcggtgaagagcgccggtgtggaagggattatgatggatgtgtgg  
tggggattggtggagagagatgcgccgggagagtataattggggcggttatgctgagctt  
atggaaatggcgaaaaacatggactcaaagtcaagctgtgatgtcttccatcaatgt  
ggtggaaacgtcggtgattcctgcacgatccctctccaagggtgggtgttgaggagatg  
gagaaggatccagatcttgcatcacagatcagtggggaaggaggaattttgaatatgta  
tcgcttggttgcatgatacacttccagttcttaagggaaggactcctgtccaatgctattct  
gatttcatgagaggggttagagatagatttgagaatctcctaggtgacaccattgtggaa  
attcaagtcgggatgggtccagctggagagctccgttatccatcctatccggaaaaagat  
ggagtatggaaattccctggaattgggtgcttttcagtgttatgacaagtacatgatcagt  
agcttacaggggtgcagcagaagcttttgtaagcctgaatggggacacaccgggtccaacc  
gatgtggtcagttacaacaattggccagaagataccaactttttcaagaaggaagggtgtg  
ggatgggtagtcaatatggggagttcttctcacttggtattctgagatgcttttgaac  
catggtgagaggatactgcaatcagccaaggcgatattcgaggacaagggtgttaagatt  
tcagttaagattgcaggtattcactggcactatggaacaagggtcccatgcccctgagctg  
accgctggatactacaacacccgtaaccgagatggttaccttcccatcgcccaaagtctt  
gcccgcacgggtgcagttttcaacttcacatgtgttgagatgcgtgaccacgagcagcca

caagatgcactatgtgcacctgagaagttggttaggcaagtggccttagcaactcaggaa  
gctcaagttccacttgctggggagaatgcattgccacgatacgatgattatgcacatgaa  
cagatccttcaagcatcctcattgaatatcaacgatcaatcaggtgatagagagatgtgc  
gcgtttacatatttgaggatgaatcctgacctattccatcctgataactggaggcgattc  
gttgcccttcgtgaagaaaatgaaagaaggaaaagacgcaaacaatgccgggaacaagta  
gagagggaggcagagcatttcgtgcatataactcagccgtagtgcaagaagctgcagct  
gccctcatgcactaagcaaattggttgcaaatagtactgtaattttgatccttttagcta  
acatggagttttcaacatgttacgaggatcttatagctcgttatcgttcttcttatatg  
ttgtaaaactgtccatcgtgtatttttcgaagttagacattatgtcttaatgaaatga  
tacataattcagtagtaaaaaaaaaaaaaa

Seq. ID Nr. 2:

MAMSLPHQIGALSGTSLTAETGGVSCEVPAKGSSATSAMWRTPM  
TNLKVSVQKTGTEIDRVSPSPSPMSPMMGGGMRPDLLACQALM  
EAQVDEVVEREYKVRNSSEKEKGVVPFVMMPLDSVKMDHTVNR  
KKAMNASLQALKSAGVEGIMMDVWWGLVERDAPGEYNWGGYA  
ELMEMAKKHGLKVQAVMSFHQCGGNVGDSCITPLRWVVEEME  
KDPDLAYTDQWGRRNFEYVSLGCDTLPVLKGRTPVQCYSDFMRG  
FRDRFENLLGDTIVEIQVGMGPAGELRYPSYPEKDGVWKFPGIGAF  
QCYDKYMISSLQGAAEAFGKPEWGHTGPTDAGQYNNWPEDTNFF  
KKEGGGWDSQYGEFFLTWYSEMLLNHGERILQSAKAIFEDKGVKI  
SVKIAGIHWHYGTRSHAPELTAGYYNTRNRDGYLPQAQMLARHGA  
VFNFCTVEMRDHEQPQDALCAPEKLVRQVALATQEAQVPLAGENA  
LPRYDDYAHEQILQASSLNINDQSGDREMCAFTYLRMNPDLFHPDN  
WRRFVAFVKMKKEGKDANKCREQVEREAHFVHITQPLVQEAAAA  
LMH

Die erfindungsgemäße  $\beta$ -Amylase-Nukleotidsequenz weist zu bekannten  $\beta$ -Amylase-kodierenden Molekülen (Wang et al., 1997, Plant Physiol. 113(2):403-409; Yoshigi et



al., 1994, *Biotechn. & Biochem.* 58(6):1080-1086; Monroe et al., 1991, *Plant Physiol.* 97:1599-1601) eine vergleichsweise geringe Sequenzhomologie auf. Die Aminosäuresequenz unterscheidet sich darüber hinaus von den im Stand der Technik beschriebenen  $\beta$ -Amylasen durch eine zusätzliche N-terminale Sequenz (Aminosäuren der Position 1-25), die auch entsprechend auf der Ebene der Nukleotidsequenz repräsentiert wird.

Erfindungsgemäß geeignete Nukleotidsequenzen, die für ein Protein der Gruppe A kodieren, sind beispielsweise für lösliche (Typ I, II, III oder IV) oder Stärkekorn-gebundene Stärkesynthase-Isoformen beschrieben in Hergersberg, 1988, Dissertation, Universität Köln; Abel, 1995, Dissertation FU Berlin; Abel et al., 1996, *Plant Journal* 10(6):981-991; Visser et al., 1989, *Plant Sci.* 64:185-192; van der Leij et al., 1991, *Mol. Gen. Genet.* 228:240-248; EP-A-0779363; WO 92/11376; WO 96/15248; WO 97/26362; WO 97/44472; WO 97/45545; Delrue et al., 1992, *J. Bacteriol.* 174: 3612-3620; Baba et al., 1993, *Plant Physiol.* 103:565-573; Dry et al., 1992, *The Plant Journal* 2,2: 193-202 oder auch in den EMBL Datenbank Einträgen X74160; X58453; X88789; X 94400; für Verzweigungsenzym-Isoformen (branching enzyme I, Iia oder Iib), Entzweigungsenzym-Isoformen (debranching enzyme, Isoamylasen, Pullulanasen, R1- Enzyme) oder Disproportionierungsenzym-Isoformen beispielsweise beschrieben in WO 92/14827; WO 95/07335; WO 95/09922; WO 96/19581; WO 97/22703; WO 97/32985; WO 97/42328; Takaha et al., 1993, *J. Biol. Chem.* 268: 1391-1396 oder auch in dem EMBL Datenbank Eintrag X83969 und solche für ADP-Glukose-Pyrophosphorylasen und plastidäre Stärkephosphorylase-Isoformen beispielsweise beschrieben in EP-A-0368506; EP-A-0455316; WO 94/28146; DE 19653176.4; WO 97/11188; Brisson et al., 1989, *The Plant Cell* 1:559-566; Buchner et al., 1996, *Planta* 199:64-73; Camirand et al., 1989, *Plant Physiol.* 89(4 Suppl.) 61; Bhatt & Knowler, *J. Exp. Botany* 41 (Suppl.) 5-7; Lin et al., 1991, *Plant Physiol.* 95:1250-1253; Sonnewald et al., 1995, *Plant Mol. Biol.* 27:567-576; DDBJ Nr. D23280; Lorberth et al., 1998, *Nature Biotechnology* 16:473-477.

Die erfindungsgemäß geeignet einzusetzenden Nukleotidsequenzen sind pro- oder eukaryontischen Ursprungs, vorzugsweise bakteriellen, pilzlichen oder pflanzlichen Ursprungs.

Der Begriff "Teile von Nukleotidsequenzen" bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung Teile der erfindungsgemäß zu verwendenden Nukleotidsequenzen, die mindestens 15 bp, vorzugsweise mindestens 150 bp, besonders bevorzugt mindestens 500 bp lang sind, jedoch eine Länge von 5000 bp, vorzugsweise 2500 bp nicht überschreiten.

Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Rahmen dieser Erfindung eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) beschrieben sind.

Besonders bevorzugt erfolgt eine "spezifische Hybridisierung", unter den folgenden hoch-stringenten Bedingungen:

Hybridisierungspuffer: 2 x SSC; 10 x Denhardt-Lösung (Fikoll 400 + PEG + BSA;

Verhältnis 1:1:1); 0,1% SDS; 5 mM EDTA; 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 250  $\mu\text{g/ml}$

Heringssperma-DNA; 50  $\mu\text{g/ml}$  tRNA; oder 0,25 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2; 1 mM EDTA; 7% SDS bei einer

Hybridisierungstemperatur: T = 55 bis 68°C,

Waschpuffer: 0,2 x SSC; 0,1% SDS und

Waschtemperatur: T = 40 bis 68°C.

Die mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen hybridisierenden Moleküle umfassen auch Fragmente, Derivate und allelische Varianten der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle. Unter Fragmenten werden dabei Teile der Nukleinsäuremo-

leküle verstanden, die lang genug sind, um einen Teil der beschriebenen Proteine zu codieren. Der Ausdruck Derivat bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Sequenzen dieser Moleküle sich von den Sequenzen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Homologie zu diesen Sequenzen aufweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 60 %, vorzugsweise über 70 % und besonders bevorzugt über 85 %. Die Abweichungen zu den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen können dabei durch Deletionen, Substitutionen, Insertionen oder Rekombinationen entstanden sein.

Homologie bedeutet ferner, daß funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betreffenden Nukleinsäuremolekülen oder den durch sie kodierten Proteinen, besteht. Bei den Nukleinsäuremolekülen, die homolog zu den erfindungsgemäßen Molekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Pflanzenspezies, oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende Varianten handeln, als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varianten.

Bei den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen kann es sich um DNA-Moleküle handeln, insbesondere um cDNA- oder genomische Moleküle. Ferner können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle RNA-Moleküle sein. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle oder Teile davon können z. B. aus natürlichen Quellen gewonnen sein, durch rekombinante Techniken oder synthetisch hergestellt sein.

Zur Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle in sense- oder antisense-Orientierung in pflanzlichen Zellen werden diese mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Hierzu zählen insbesondere Promotoren. Generell kommt für die Expression jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor in Frage. Der Promotor kann dabei so gewählt sein, daß die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt, der z.B. chemisch oder biologisch induzierbar sein kann. In Bezug auf die transformierte Pflanze kann der Promotor - wie auch die Nukleotidsequenz - homolog oder heterolog sein. Geeignete Promotoren sind z.B. der Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus für eine konstitutive Expression, der Patatingen-Promotor B33 (Rocha-Sosa et al., 1989, EMBO J. 8:23-29) für eine knollenspezifische Expression in Kartoffeln oder ein Promotor, der eine Expression lediglich in photosynthetisch aktiven Geweben sicherstellt, z.B. der ST-LS1-Promotor (Stockhaus et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7943-7947; Stockhaus et al., 1989, EMBO J. 8: 2445-2451) oder für eine endosperm-spezifische Expression der HMG-Promotor aus Weizen oder Promotoren von Zein-Genen aus Mais.

Eine das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül abschließende Terminationssequenz kann der korrekten Beendigung der Transkription dienen, sowie der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript, dem eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen wird. Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben (vgl. Gielen et al., 1989, EMBO J. 8:23-29) und sind beliebig austauschbar.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können für die Herstellung transgener Pflanzenzellen und Pflanzen verwendet werden, die in der Aktivität der  $\beta$ -Amylase oder in der Aktivität der  $\beta$ -Amylase und mindestens eines weiteren Enzyms des Stärkemetabolismus erhöht oder erniedrigt sind. Hierfür werden die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle in geeignete Vektoren eingebracht, mit den notwendigen regulatorischen Nukleinsäure-Sequenzen für eine effiziente Transkription

in pflanzlichen Zellen versehen und in pflanzliche Zellen eingeführt. Es besteht zum einen die Möglichkeit, die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle zur Inhibierung der Synthese der endogenen  $\beta$ -Amylase oder der endogenen  $\beta$ -Amylase und mindestens eines weiteren Proteins der Gruppe A in den Zellen zu verwenden. Dies kann mit Hilfe von antisense-Konstrukten, in vivo Mutagenese, eines auftretenden Cosuppressionseffektes oder mit Hilfe von in entsprechender Weise konstruierten Ribozymen erreicht werden. Andererseits können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle zur Expression der  $\beta$ -Amylase oder der  $\beta$ -Amylase und mindestens eines weiteren Proteins der Gruppe A in Zellen transgener Pflanzen verwendet werden und so zu einer Steigerung der Aktivität der jeweils exprimierten Enzyme in den Zellen führen.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle zur Inhibierung der Synthese der endogenen  $\beta$ -Amylase und der Überexpression mindestens eines weiteren Proteins der Gruppe A in den Zellen zu verwenden.

Schließlich können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle auch zur Expression der  $\beta$ -Amylase und der Inhibierung mindestens eines weiteren Proteins der Gruppe A in Zellen transgener Pflanzen verwendet werden. Die beiden letztgenannten Ausführungsformen der Erfindung führen so zu einer gleichzeitigen Hemmung und Steigerung der Aktivitäten der jeweils inhibierten bzw. exprimierten Enzyme in den Zellen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Vektor, enthaltend ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül.

Der Begriff "Vektor" umfaßt Plasmide, Cosmide, Viren, Bacteriophagen und andere in der Gentechnik gängige Vektoren, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle enthalten und zur Transformation von Zellen geeignet sind. Vorzugsweise sind derartige Vektoren zur Transformation pflanzlicher Zellen geeignet. Besonders

bevorzugt erlauben sie die Integration der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle, gegebenenfalls zusammen mit flankierenden regulatorischen Regionen, in das Genom der Pflanzenzelle. Beispiele hierfür sind binäre Vektoren, wie pBinAR oder pBinB33, die bei dem Agrobakterien-vermittelten Gentransfer eingesetzt werden können.

In einer bevorzugten Ausführungsform zeichnet sich der erfindungsgemäße Vektor dadurch aus, daß die Nukleotidsequenz, die für ein Protein mit der Funktion einer  $\beta$ -Amylase codiert oder deren Teile in sense- oder anti-sense-Richtung vorliegt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform zeichnet sich der erfindungsgemäße Vektor dadurch aus, daß die Nukleotidsequenz, die für ein oder mehrere Proteine ausgewählt aus der Gruppe A oder Teilen davon kodiert, in sense- oder anti-sense-Richtung vorliegt.

In noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform zeichnet sich der erfindungsgemäße Vektor dadurch aus, daß die Nukleotidsequenz, die für mehrere Proteine ausgewählt aus der Gruppe A oder Teilen davon kodiert, teilweise in sense-Richtung und teilweise in anti-sense-Richtung vorliegt.

Der erfindungsgemäße Vektor ist ganz besonders bevorzugt mit regulatorischen Elementen verknüpft, die die Expression, d.h. z.B. die Transkription und Synthese einer RNA, die im Fall einer in sense-Richtung vorliegenden Nukleotidsequenz translatierbar ist, in einer pro- oder eukaryontischen Zelle gewährleisten.

Darüberhinaus ist es möglich, mittels gängiger molekularbiologischer Techniken (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY) verschiedenartige Mutationen in die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen einzuführen, wodurch es zur Synthese von Proteinen mit gegebenenfalls veränderten biologischen Eigenschaften kommt. Hierbei ist zum einen die Erzeugung von Deletionsmutanten möglich, bei

denen durch fortschreitende Deletionen vom 5'- oder vom 3'- Ende der kodierenden DNA-Sequenzen erzeugt werden, die zur Synthese entsprechend verkürzter Proteine führen. Durch derartige Deletionen am 5'-Ende der DNA-Sequenz ist es beispielsweise möglich, gezielt Enzyme herzustellen, die durch Entfernen der entsprechenden Transit- oder Signal-Sequenzen nicht mehr in ihrem ursprünglichen (homologen) Kompartiment, sondern im Cytosol, oder aufgrund der Addition von anderen Signalsequenzen in einem oder mehreren anderen (heterologen) Kompartimenten lokalisiert sind.

Andererseits ist auch die Einführung von Punktmutationen denkbar an Positionen, bei denen eine Veränderung der Aminosäuresequenz einen Einfluß beispielweise auf die Enzymaktivität oder die Regulierung des Enzyms hat. Auf diese Weise können z.B. Mutanten hergestellt werden, die einen veränderten  $K_M$ - oder  $k_{cat}$ -Wert besitzen oder die nicht mehr den normalerweise in der Zelle vorliegenden Regulationsmechanismen über allosterische Regulation oder kovalente Modifizierung unterliegen.

Für die gentechnische Manipulation in prokaryontischen Zellen können die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen oder Teile dieser Sequenzen in Plasmide eingebracht werden, die eine Mutagenese oder eine Sequenzveränderung durch Rekombination von DNA-Sequenzen erlauben. Mit Hilfe von molekularbiologischen Standardverfahren (vgl. Sambrook et al., 1989, loc.cit.) können Basenaustausche vorgenommen oder natürliche oder synthetische Sequenzen hinzugefügt werden. Für die Verbindung der DNA-Fragmente untereinander können an die Fragmente Adaptoren oder *linker* angesetzt werden. Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen zur Verfügung stellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "*primer repair*", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Als Analysemethoden werden im allgemeinen eine Sequenzanalyse, eine Restriktionsanalyse und ggf. weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden durchgeführt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Wirtszelle, insbesondere prokaryontische oder eukaryontische Zellen, vorzugsweise bakterielle oder pflanzliche Zellen (z.B. aus E.coli, Agrobacterium, Solananceae, Poideae, Roggen, Gerste, Hafer, Mais, Weizen, Hirse, Sago, Reis, Erbse, Markerbse, Maniok, Kartoffel, Tomate, Raps, Sojabohne, Hanf, Flachs, Sonnenblume, Kuherbse, Mungbohne, Bohne, Banane oder Arrowroot), die ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßen Vektor enthält oder die von einer Zelle, die mit einem erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert wurde, abstammt.

Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Wirtszelle, insbesondere prokaryontische oder eukaryontische Zellen, vorzugsweise bakterielle oder pflanzliche Zellen (z.B. aus E.coli, Agrobacterium, Solananceae, Poideae, Roggen, Gerste, Hafer, Mais, Weizen, Hirse, Sago, Reis, Erbse, Markerbse, Maniok, Kartoffel, Tomate, Raps, Sojabohne, Hanf, Flachs, Sonnenblume, Kuherbse, Mungbohne, Bohne, Banane oder Arrowroot), die neben einem rekombinanten Nukleinsäuremolekül codierend für ein Protein mit der Funktion einer  $\beta$ -Amylase, ein oder mehrere weitere rekombinante Nukleinsäuremoleküle enthält, die für ein Protein ausgewählt aus der Gruppe A kodieren, oder deren Teilen oder mit diesen Nukleinsäuremolekülen hybridisierende Nukleotidsequenzen.

Neben der Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle lassen sich die erfindungsgemäßen Wirtszellen ggf. auch durch sukzessive Transformation herstellen (sog. "Supertransformation"), indem einzelne Nukleotidsequenzen oder Vektoren enthaltend Nukleotidsequenzen, die für ein Protein codieren mit der Funktion von Verzweigungsenzymen, ADP-Glukose-Pyrophosphorylasen, Stärkekorn-gebundenen Stärkesynthasen, löslichen Stärkesynthasen I, II, III oder IV, Entzweigungsenzymen, Disproportionierungsenzymen, plastidären Stärkephosphorylasen, R1-Enzymen, Amylasen, Glukosidasen, Teilen davon, sowie Nukleinsäuremoleküle, die mit einem der besagten Nukleotidsequenzen oder deren Teilen hybridisiert, in mehreren,



aufeinanderfolgenden Transformationen der Zellen eingesetzt werden.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanzenzelle, die eine modifizierte Stärke synthetisiert, dadurch gekennzeichnet, daß ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül oder ein erfindungsgemäßer Vektor in das Genom einer Pflanzenzelle integriert wird.

Durch die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle ist es möglich, mit Hilfe gentechnischer Methoden in den Stärkemetabolismus von Pflanzen einzugreifen und ihn dahingehend zu verändern, daß es zur Synthese einer modifizierten Stärke kommt, die beispielsweise in bezug auf Struktur, Wassergehalt, Proteingehalt, Lipidgehalt, Fasergehalt, Asche/Phosphatgehalt, Amylose/Amylopektinverhältnis, Molmassenverteilung, Verzweigungsgrad, Korngröße und -form sowie Kristallisation oder auch in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften wie Fließ- und Sorptionsverhalten, Verkleisterungstemperatur, Viskosität, Dickungsleistung, Löslichkeit, Kleisterstruktur, Transparenz, Hitze-, Scher- und Säurestabilität, Retrogradationsneigung, Gelbildung, Gefrier/Taustabilität, Komplexbildung, Jodbindung, Filmbildung, Klebekraft, Enzymstabilität, Verdaulichkeit oder Reaktivität im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist. Durch eine Erhöhung der Aktivität von am Stärkemetabolismus beteiligten Proteinen, beispielsweise durch Überexpression entsprechender Nukleinsäuremoleküle, oder durch die Bereitstellung von Mutanten, die nicht mehr den zelleigenen Regulationsmechanismen unterliegen und/oder unterschiedliche Temperaturabhängigkeiten in bezug auf ihre Aktivität besitzen, besteht die Möglichkeit der Ertragssteigerung in entsprechend gentechnisch veränderten Pflanzen. Durch die Steigerung der Aktivität einer oder mehrerer am Stärkemetabolismus beteiligten Proteinen in bestimmten Zellen der stärkepeichernden Gewebe transformierter Pflanzen wie z.B. in der Knolle bei der Kartoffel oder in dem Endosperm von Mais oder Weizen kann es zu einer besonders ausgeprägten Ertragssteigerung kommen. Die wirtschaftliche Bedeutung und die

Vorteile dieser Möglichkeiten des Eingriffs in den Stärkemetabolismus liegen auf der Hand.

Bei der Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle in Pflanzen besteht grundsätzlich die Möglichkeit, daß das synthetisierte Protein in jedem beliebigen Kompartiment der pflanzlichen Zelle lokalisiert sein kann. Um die Lokalisation in einem bestimmten Kompartiment (Cytosol, Vakuole, Apoplast, Plastiden, Mitochondrien) zu erreichen, muß die die Lokalisation gewährleistende Transit- oder Signalsequenz ggf. deletiert (entfernt) werden und die verbleibende codierende Region gegebenenfalls mit DNA-Sequenzen verknüpft werden, die die Lokalisierung in dem jeweiligen Kompartiment gewährleisten. Derartige Sequenzen sind bekannt (siehe beispielsweise Braun et al., EMBO J. 11 (1992), 3219-3227; Wolter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 846-850; Sonnewald et al., Plant J. 1 (1991), 95-106).

Die Herstellung von Pflanzenzellen mit einer verringerten Aktivität eines am Stärkemetabolismus beteiligten Proteins kann beispielsweise erzielt werden durch die Expression einer entsprechenden antisense-RNA, einer sense-RNA zur Erzielung eines Cosuppressionseffektes, in vivo Mutagenese oder die Expression eines entsprechend konstruierten Ribozyms, das spezifisch Transkripte spaltet, die eines der am Stärkemetabolismus beteiligten Proteine codieren, unter Verwendung eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls, vorzugsweise durch Expression eines antisense-Transkripts.

Hierzu kann zum einen ein DNA-Molekül verwendet werden, das die gesamte für ein am Stärkemetabolismus beteiligtes Protein codierende Sequenz einschließlich eventuell vorhandener flankierender Sequenzen umfaßt, als auch DNA-Moleküle, die nur Teile der codierenden Sequenz umfassen, wobei diese Teile eine Mindestlänge von 15 bp, vorzugsweise von mindestens 100-500 bp, und insbesondere von über 500 bp aufweisen. In der Regel werden DNA-Moleküle verwendet, die kürzer als 5000 bp, vorzugsweise kürzer als 2500 bp sind.

Möglich ist auch die Verwendung von DNA-Sequenzen, die einen hohen Grad an Homologie zu den Sequenzen der erfindungsgemäßen DNA-Moleküle aufweisen, aber nicht vollkommen identisch sind. Die minimale Homologie sollte größer als ca. 65 % sein. Die Verwendung von Sequenzen mit einer Homologie von 75% und insbesondere 80 % ist zu bevorzugen.

Die Expression von Ribozymen zur Verringerung der Aktivität von bestimmten Proteinen in Zellen ist dem Fachmann bekannt und ist beispielsweise beschrieben in EP-B1-O 321 201. Die Expression von Ribozymen in pflanzlichen Zellen wurden z.B. beschrieben in Feyter et al. (Mol. Gen. Genet. 250 (1996), 329-338).

Ferner kann die Verringerung der am Stärkemetabolismus beteiligten Proteine in den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen auch durch die sogenannte "in vivo-Mutagenese" erreicht werden, bei der durch Transformation von Zellen ein hybrides RNA-DNA-Oligonucleotid ("Chimeroplast") in Zellen eingeführt wird (Kipp P.B. et al., Poster Session beim "5<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology, 21-27, September 1997, Singapore; R.A. Dixon und C.J. Arntzen, Meeting report zu "Metabolic Engineering in Transgenic Plants", Keystone Symposia, Copper Mountain, CO, USA, TIBTECH 15 (1997), 441-447; internationale Patentanmeldung WO 95/15972; Kren et al., Hepatology 25 (1997), 1462-1468; Cole-Strauss et al., Science 273 (1996), 1386-1389).

Ein Teil der DNA-Komponente des hierbei verwendeten RNA-DNA-Oligonucleotids ist homolog zu einer Nucleinsäuresequenz eines endogenen Proteins, weist jedoch im Vergleich zur Nucleinsäuresequenz des endogenen Proteins eine Mutation auf oder enthält eine heterologe Region, die von den homologen Regionen umschlossen ist.

Durch Basenpaarung der homologen Regionen des RNA-DNA-Oligonucleotids und des endogenen Nucleinsäuremoleküls, gefolgt von homologer Rekombination kann die in der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids enthaltene Mutation oder

heterologen Region in das Genom einer Pflanzenzelle übertragen werden. Dies führt zu einer Verringerung der Aktivität des am Stärkemetabolismus beteiligten Proteins.

Alternativ kann die Verringerung der am Stärkemetabolismus beteiligten Enzymaktivitäten in den Pflanzenzellen durch einen Cosuppressionseffekt erfolgen. Dieses Verfahren ist dem Fachmann bekannt und beispielsweise beschrieben in Jorgensen (Trends Biotechnol. 8 (1990), 340-344), Niebel et al., (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 91-103), Flavell et al. (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 43-46), Palaqui und Vaucheret (Plant. Mol. Biol. 29 (1995), 149-159), Vaucheret et al., (Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 311-317), de Borne et al. (Mol. Gen. Genet. 243 (1994), 613-621) und anderen Quellen.

Zur Inhibierung der Synthese mehrerer an der Stärkebiosynthese beteiligter Enzyme in den transformierten Pflanzen können DNA-Moleküle zur Transformation verwendet werden, die gleichzeitig mehrere, die entsprechenden Enzyme codierenden Regionen in antisense-Orientierung unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors enthalten. Hierbei kann alternativ jede Sequenz unter der Kontrolle eines eigenen Promotors stehen, oder die Sequenzen können als Fusion von einem gemeinsamen Promotor transkribiert werden, so daß die Synthese der betreffenden Proteine in etwa gleichem oder unterschiedlichem Ausmaß inhibiert wird. Für die Länge der einzelnen codierenden Regionen, die in einem derartigen Konstrukt verwendet werden, gilt das, was oben bereits für die Herstellung von antisense-Konstrukten ausgeführt wurde. Eine obere Grenze für die Anzahl der in einem derartigen DNA-Molekül von einem Promotor aus transkribierten antisense-Fragmente gibt es im Prinzip nicht. Das entstehende Transkript sollte aber in der Regel eine Länge von 25 kb, vorzugsweise von 15 kb nicht überschreiten.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle ist es möglich, Pflanzenzellen zu transformieren und die Synthese mehrerer Enzyme gleichzeitig zu inhibieren.

Weiterhin können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle in klassische Mutanten eingebracht werden, die in bezug auf ein oder mehrere Gene der Stärkebiosynthese defizient oder defekt sind (Shannon und Garwood, 1984, in Whistler, BeMiller und Paschall, Starch:Chemistry and Technology, Academic Press, London, 2nd Edition: 25-86). Diese Defekte können sich z.B. auf folgende Proteine beziehen: Stärkekorn-gebundene (GBSS I) und lösliche Stärkesynthasen (SSS I, II, III und IV), Verzweigungsenzyme (BE I, IIa und IIb), "Debranching"-Enzyme (R-Enzyme, Isoamylasen, Pullulanasen), Disproportionierungsenzyme und plastidäre Stärkephosphorylasen.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch transgene Pflanzenzellen, erhältlich nach einem erfindungsgemäßen Verfahren, die mit einem erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül oder Vektor transformiert wurden, sowie transgene Pflanzenzellen, die von derartig transformierten Zellen abstammen. Die erfindungsgemäßen Zellen enthalten ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, wobei dieses vorzugsweise mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft ist, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten, insbesondere mit einem Promotor. Die erfindungsgemäßen Zellen lassen sich von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen unter anderem dadurch unterscheiden, daß sie ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül enthalten, das natürlicherweise in diesen Zellen nicht vorkommt oder dadurch, daß ein solches Molekül an einem Ort im Genom der Zelle integriert vorliegt, an dem es sonst nicht vorkommt, d.h. in einer anderen genomischen Umgebung. Ferner lassen sich die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen dadurch unterscheiden, daß sie mindestens eine Kopie eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls stabil integriert in ihr Genom enthalten, gegebenenfalls zusätzlich zu natürlicherweise in den Zellen vorkommenden Kopien eines solchen Moleküls. Handelt es sich bei dem (den) in die Zellen eingeführten Nukleinsäuremolekül(en) um zusätzliche Kopien zu bereits natürlicherweise in den Zellen vorkommenden Molekülen, so lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen von natürlicherweise vorkommenden insbesondere

dadurch unterscheiden, daß diese zusätzliche(n) Kopie(n) an Orten im Genom „lokalisiert ist (sind) an denen sie natürlicherweise nicht vorkommt (vorkommen). Dies läßt sich beispielsweise mit Hilfe einer Southern Blot-Analyse nachprüfen.

Bevorzugt sind solche erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, in denen die Enzymaktivität einzelner, am Stärkemetabolismus beteiligter Enzyme zu mindestens 10%, besonders bevorzugt zu mindestens 30% und ganz besonders bevorzugt um mindestens 50% erhöht oder erniedrigt ist.

Weiterhin lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen vorzugsweise durch mindestens eines der folgenden Merkmale unterscheiden: Ist das eingeführte erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül heterolog in Bezug auf die Pflanzenzelle, so weisen die transgenen Pflanzenzellen Transkripte der eingeführten erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle auf. Diese lassen sich z. B. durch Northern-Blot-Analyse nachweisen. Beispielsweise enthalten die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen ein oder mehrere Proteine, die durch ein eingeführtes erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül codiert werden. Dies kann z. B. durch immunologische Methoden, insbesondere durch eine Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden.

Ist das eingeführte erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül homolog in Bezug auf die Pflanzenzelle, können die erfindungsgemäßen Zellen von natürlicherweise auftretenden beispielsweise aufgrund der zusätzlichen Expression erfindungsgemäßer Nukleinsäuremoleküle unterschieden werden. Die transgenen Pflanzenzellen enthalten z.B. mehr oder weniger Transkripte der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle. Dies kann z. B. durch Northern-Blot-Analyse nachgewiesen werden. "Mehr" bzw. "weniger" bedeutet dabei vorzugsweise mindestens 10% mehr bzw. weniger, bevorzugt mindestens 20% mehr bzw. weniger und besonders bevorzugt mindestens 50% mehr bzw. weniger Transkripte als entsprechende nicht-transformierte Zellen. Vorzugsweise weisen die Zellen ferner eine entsprechende (mindestens 10%, 20%

bzw. 50%ige) Steigerung bzw. Verminderung des Gehalts an erfindungsgemäßen Protein auf. Die transgenen Pflanzenzellen können nach dem Fachmann bekannten Techniken zu ganzen Pflanzen regeneriert werden.

Die durch Regeneration der erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen erhältlichen Pflanzen sowie Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen durch Regeneration von ganzen Pflanzen aus den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ferner sind Gegenstand der Erfindung Pflanzen, die die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen enthalten. Bei den transgenen Pflanzen kann es sich prinzipiell um Pflanzen jeder beliebigen Spezies handeln, d.h. sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Nutzpflanzen, d.h. Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke. Vorzugsweise sind dies stärke-speichernde Pflanzen, wie z.B. Getreidearten (Roggen, Gerste, Hafer, Mais, Weizen, Hirse, Sago etc.), Reis, Erbse, Markerbse, Maniok, Kartoffel, Tomate, Raps, Sojabohne, Hanf, Flachs, Sonnenblume, Kuherbse, Mungbohne oder Arrowroot.

Die Erfindung betrifft ebenfalls Vermehrungsmaterial der erfindungsgemäßen Pflanzen, beispielsweise Früchte, Samen, Knollen, Wurzelstöcke, Sämlinge, Stecklinge, Kalli, Protoplasten, Zellkulturen etc..

Durch die Veränderung der enzymatischen Aktivitäten der in den Stärkemetabolismus involvierten Enzyme kommt es zur Synthese einer in ihrer Struktur veränderten Stärke in den nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Pflanzen.

Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für *E.coli* und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw.

Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von *E.coli*-Zellen verwendet. Transformierte *E.coli*-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet, anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysemethode zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt (Sambrook et al. loc.cit.). Nach jeder Manipulation kann die Plasmid DNA gespalten und gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden kloniert werden.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, mittels Polyethylenglykol (PEG), die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide bzw. DNA gestellt. Es können einfache Plasmide wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist jedoch die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens notwendig.

Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der Ti- und Ri-Plasmid T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden.



Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muß die einzuführende DNA in spezielle Plasmide kloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären Vektor oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige *vir*-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in *E.coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen *Linker* oder *Polylinker*, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol. Gen. Genet. 163:181-187). Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium sollte ein Plasmid, das eine *vir*-Region trägt, enthalten. Die *vir*-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet.

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanter B.V., Alblasterdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4: 1-46 und An et al. (1985) EMBO J. 4: 277-287 beschrieben worden.

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen

regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden. Andere Möglichkeiten der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Protoplastentransformation sind bekannt (vgl. z.B. Willmitzer, L, 1993 Transgenic plants. In: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, eds.), Vol. 2, 627-659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge).

Während die Transformation dikotyler Pflanzen über Ti-Plasmid-Vektorsysteme mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* wohl etabliert ist, weisen neuere Arbeiten darauf hin, daß auch monokotyle Pflanzen der Transformation mittels *Agrobacterium* basierender Vektoren sehr wohl zugänglich sind (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6 (1994), 271-282).

Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen sind die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes, die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern.

Spezifisch die Transformation von Mais wird in der Literatur verschiedentlich beschrieben (vgl. z.B. WO95/06128, EP 0 513 849; EP 0 465 875). In EP 292 435 wird ein Verfahren beschrieben, mit Hilfe dessen, ausgehend von einem schleimlosen, weichen (friable) granulösen Mais-Kallus, fertile Pflanzen erhalten werden können. Shillito et al. (Bio/Technology 7 (1989), 581) haben in diesem Zusammenhang beobachtet, daß es ferner für die Regenerierbarkeit zu fertilen Pflanzen notwendig ist, von Kallus-Suspensionskulturen auszugehen, aus denen eine sich teilende Protoplastenkultur, mit der Fähigkeit zu Pflanzen zu regenerieren, herstellbar ist. Nach einer in vitro Kultivierungszeit von 7 bis 8 Monaten erhalten Shillito et al. Pflanzen mit lebensfähigen Nachkommen, die jedoch Abnormalitäten in der Morphologie und der Reproduktivität aufweisen. Prioli und Söndahl (Bio/Technology 7 (1989), 589)

beschreiben ebenfalls die Regeneration und die Gewinnung fertiler Mais-Pflanzen aus „Mais-Protoplasten.

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinothricin u.a. vermittelt. Der individuelle gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten.

Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Merkmale.

Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Merkmale erhalten geblieben sind.

Ebenfalls ist ein weiterer Erfindungsgegenstand ein Verfahren zur Herstellung von Stärke in an sich bekannter Weise, worin erfindungsgemäße Pflanzenzellen, Pflanzen, Pflanzenteilen oder Vermehrungsmaterial verarbeitet bzw. in das Verfahren integriert werden.

Verfahren zur Extraktion der Stärke aus Pflanzen oder aus stärkespeichernden Teilen von Pflanzen sind dem Fachmann bekannt. Verfahren zur Extraktion von Stärke aus

Maissamen sind z. B. in Eckhoff et al. (Cereal Chem. 73 (1996) 54-57) beschrieben. Die Extraktion von Maisstärke im industriellen Maßstab wird in der Regel durch das sogenannte "wet milling" erreicht. Weiterhin sind Verfahren zur Extraktion der Stärke aus verschiedenen stärke-speichernden Pflanzen beschrieben, z. B. in "Starch: Chemistry and Technology (Hrsg.: Whistler, BeMiller und Paschall (1994), 2. Ausgabe, Academic Press Inc. London Ltd; ISBN 0-12-746270-8; siehe z. B. Kapitel XII, Seite 412-468: Mais und Sorghum-Stärken: Herstellung; von Watson; Kapitel XIII, Seite 469-479: Tapioca-, Arrowroot- und Sagostärken: Herstellung; von Corbishley und Miller; Kapitel XIV, Seite 479-490: Kartoffelstärke: Herstellung und Verwendungen; von Mitch; Kapitel XV, Seite 491 bis 506: Weizenstärke: Herstellung, Modifizierung und Verwendungen; von Knight und Oson; und Kapitel XVI, Seite 507 bis 528: Reisstärke: Herstellung und Verwendungen; von Rohmer und Klem). Vorrichtungen, die für gewöhnlich bei Verfahren zur Extraktion von Stärke von Pflanzenmaterial verwendet werden, sind Separatoren, Dekanter, Hydrocyclone, Sprühtrockner und Wirbelschichttrockner.

Die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren aufgrund der Expression eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls eine Stärke, die beispielsweise in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist.

Noch ein weiterer Erfindungsgegenstand ist auch die Stärke, die aus einer erfindungsgemäßen Pflanzenzelle, Pflanze, deren Vermehrungsmaterial oder einem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlich ist.

Zu einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung zählt auch die industrielle Verwendung der erfindungsgemäßen Stärke zur Herstellung von Nahrungsmitteln, Verpackungsmaterialien oder Einwegartikeln.

Die erfindungsgemäßen Stärke kann nach dem Fachmann bekannten Verfahren

modifiziert werden und eignet sich in unmodifizierter oder modifizierter Form für verschiedene Verwendungen im Nahrungsmittel- oder Nicht-Nahrungsmittelbereich.

Die Einsatzmöglichkeiten der erfindungsgemäßen Stärke lassen sich grundsätzlich in zwei große Bereiche unterteilen. Der eine Bereich umfaßt die Hydrolyseprodukte der Stärke, hauptsächlich Glukose und Glukosebausteine, die über enzymatische oder chemische Verfahren erhalten werden. Sie dienen als Ausgangsstoff für weitere chemische Modifikationen und Prozesse, wie Fermentation. Von Bedeutung kann hier die Einfachheit und kostengünstige Ausführung eines Hydrolyseverfahrens sein, wie es gegenwärtig im wesentlichen enzymatisch unter Verwendung von Amyloglukosidase verläuft. Vorstellbar wäre eine Kosteneinsparung durch einen geringeren Einsatz von Enzymen. Eine Strukturveränderung der Stärke, z.B. Oberflächenvergrößerung des Korns, leichtere Verdaulichkeit durch geringeren Verzweigungsgrad oder eine sterische Struktur, die die Zugänglichkeit für die eingesetzten Enzyme begrenzt, könnte dies bewirken.

Der andere Bereich, in dem die erfindungsgemäße Stärke wegen ihrer polymeren Struktur als sogenannte native Stärke verwendet werden kann, gliedert sich in zwei weitere Einsatzgebiete:

#### 1. Nahrungsmittelindustrie

Stärke ist ein klassischer Zusatzstoff für viele Nahrungsmittel, bei denen sie im wesentlichen die Funktion des Bindens von wäßrigen Zusatzstoffen übernimmt bzw. eine Erhöhung der Viskosität oder aber eine erhöhte Gelbildung hervorruft. Wichtige Eigenschaftsmerkmale sind das Fließ- und Sorptionsverhalten, die Quell- und Verkleisterungstemperatur, die Viskosität und Dickungsleistung, die Löslichkeit der Stärke, die Transparenz und Kleisterstruktur, die Hitze-, Scher- und Säurestabilität, die Neigung zur Retrogradation, die Fähigkeit zur Filmbildung, die Gefrier/Taustabilität, die Verdaulichkeit sowie die Fähigkeit zur Komplexbildung mit z.B. anorganischen oder organischen Ionen.

## 2. Nicht-Nahrungsmittelindustrie

In diesem großen Bereich wird Stärke als Hilfsstoff für unterschiedliche Herstellungsprozesse bzw. als Zusatzstoff in technischen Produkten eingesetzt. Bei der Verwendung von Stärke als Hilfsstoff ist hier insbesondere die Papier- und Pappeindustrie zu nennen. Stärke dient dabei in erster Linie zur Retardation (Zurückhaltung von Feststoffen), der Abbindung von Füllstoff- und Feinstoffteilchen, als Festigungsstoff und zur Entwässerung. Darüber hinaus werden die günstigen Eigenschaften der Stärke in bezug auf die Steifigkeit, die Härte, den Klang, den Griff, den Glanz, die Glätte, die Spaltfestigkeit sowie die Oberflächen ausgenutzt.

### 2.1. Papier- und Pappeindustrie

Innerhalb des Papierherstellungsprozesses sind vier Anwendungsbereiche, nämlich Oberfläche, Strich, Masse und Sprühen, zu unterscheiden. Auf die Oberflächenstärke entfällt mit 80 % des Verbrauchs die mit Abstand größte Stärkemenge, 8 % werden als Strichstärke, 7 % als Massestärke und 5 % als Sprühstärke eingesetzt.

Die Anforderungen an die Stärke in bezug auf die Oberflächenbehandlung sind im wesentlichen ein hoher Weißegrad, eine angepaßte Viskosität, eine hohe Viskositätsstabilität, eine gute Filmbildung sowie eine geringe Staubbildung. Bei der Verwendung im Strich spielt der Feststoffgehalt, eine angepaßte Viskosität, ein hohes Bindevermögen sowie eine hohe Pigmentaffinität eine wichtige Rolle. Als Zusatz zur Masse ist eine rasche, gleichmäßige, verlustfreie Verteilung, eine hohe mechanische Stabilität und eine vollständige Zurückhaltung im Papierfließ von Bedeutung. Beim Einsatz der Stärke im Sprühbereich sind ebenfalls ein angepaßter Feststoffgehalt, hohe Viskosität sowie ein hohes Bindevermögen von Bedeutung.

### 2.2. Klebstoffindustrie

Ein großer Einsatzbereich von Stärken besteht in der Klebstoffindustrie, wo man die Einsatzmöglichkeiten in vier Teilbereiche gliedert: die Verwendung als reinem Stärkeleim, die Verwendung bei mit speziellen Chemikalien aufbereiteten

Stärkeleimen, die Verwendung von Stärke als Zusatz zu synthetischen Harzen und Polymerdispersionen sowie die Verwendung von Stärken als Streckmittel für synthetische Klebstoffe. 90 % der Klebstoffe auf Stärkebasis werden in den Bereichen Wellpappenherstellung, Herstellung von Papiersäcken, Beuteln und Tüten, Herstellung von Verbundmaterialien für Papier und Aluminium, Herstellung von Kartonagen und Wiederbefeuchtungsleim für Briefumschläge, Briefmarken usw. eingesetzt.

### 2.3. Textil- und Textilpflegemittelindustrie

Ein großes Einsatzfeld für Stärken als Hilfsmittel und Zusatzstoff ist der Bereich Herstellung von Textilien und Textilpflegemitteln. Innerhalb der Textilindustrie sind die folgenden vier Einsatzbereiche zu unterscheiden: Der Einsatz der Stärke als Schlichtmittel, d.h. als Hilfsmittel zur Glättung und Stärkung des Klettverhaltens zum Schutz gegen die beim Weben angreifenden Zugkräfte sowie zur Erhöhung der Abriebfestigkeit beim Weben, Stärke als Mittel zur Textilaufrüstung vor allem nach qualitätsverschlechternden Vorbehandlungen, wie Bleichen, Färben usw., Stärke als Verdickungsmittel bei der Herstellung von Farbpasten zur Verhinderung von Farbstoffdiffusionen sowie Stärke als Zusatz zu Kettungsmitteln für Nähgarne.

### 2.4. Baustoffindustrie

Der vierte Einsatzbereich ist die Verwendung von Stärken als Zusatz bei Baustoffen. Ein Beispiel ist die Herstellung von Gipskartonplatten, bei der die im Gipsbrei vermischte Stärke mit dem Wasser verkleistert, an die Oberfläche der Gipsplatte diffundiert und dort den Karton an die Platte bindet. Weitere Einsatzbereiche sind die Beimischung zu Putz- und Mineralfasern. Bei Transportbeton werden Stärkeprodukte zur Verzögerung der Abbindung eingesetzt.

### 2.5. Bodenstabilisation

Ein mengenmäßig begrenzter Markt für Stärkeprodukte bietet sich bei der Herstellung von Mitteln zur Bodenstabilisation an, die bei künstlichen Erdbewegungen zum

temporären Schutz der Bodenpartikel gegenüber Wasser eingesetzt werden. Kombinationsprodukte aus Stärke und Polymeremulsionen sind nach heutiger Kenntnis in ihrer Erosions- und verkrustungsmindernden Wirkung den bisher eingesetzten Produkten gleichzusetzen, liegen preislich aber deutlich unter diesen.

#### 2.6. Einsatz bei Pflanzenschutz- und Düngemitteln

Ein Einsatzbereich liegt bei der Verwendung der Stärke in Pflanzenschutzmitteln zur Veränderung der spezifischen Eigenschaften der Präparate. So werden Stärken zur Verbesserung der Benetzung von Pflanzenschutz- und Düngemitteln, zur dosierten Freigabe der Wirkstoffe, zur Umwandlung flüssiger, flüchtiger und/oder übelriechender Wirkstoffe in mikrokristalline, stabile, formbare Substanzen, zur Mischung inkompatibler Verbindungen und zur Verlängerung der Wirkdauer durch Verminderung der Zersetzung eingesetzt.

#### 2.7. Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie

Ein weiteres Einsatzgebiet besteht im Bereich der Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie. In der pharmazeutischen Industrie werden Stärken als Bindemittel für Tabletten oder zur Bindemittelverdünnung in Kapseln eingesetzt. Weiterhin dienen Stärken als Tablettensprengmittel, da sie nach dem Schlucken Flüssigkeit absorbieren und nach kurzer Zeit soweit quellen, daß der Wirkstoff freigesetzt wird. Medizinische Gleit- und Wundpuder basieren aus qualitativen Gründen auf Stärke. Im Bereich der Kosmetik werden Stärken beispielsweise als Träger von Puderzusatzstoffen, wie Düften und Salicylsäure eingesetzt. Ein relativ großer Anwendungsbereich für Stärke liegt bei Zahnpasta.

#### 2.8. Stärkezusatz zu Kohle und Brikett

Einen Einsatzbereich bietet die Stärke als Zusatzstoff zu Kohle und Brikett. Kohle kann mit einem Stärkezusatz quantitativ hochwertig agglomeriert bzw. brikettiert werden, wodurch ein frühzeitiges Zerfallen der Briketts verhindert wird. Der Stärkezusatz liegt bei Grillkohle zwischen 4 und 6 %, bei kalorierter Kohle zwischen



0,1 und 0,5 %. Des weiteren gewinnen Stärken als Bindemittel an Bedeutung, da durch ihren Zusatz zu Kohle und Brikett der Ausstoß schädlicher Stoffe deutlich vermindert werden kann.

#### 2.9. Erz- und Kohleschlammaufbereitung

Stärke kann ferner bei der Erz- und Kohleschlammaufbereitung als Flockungsmittel eingesetzt werden.

#### 2.10. Gießereihilfsstoff

Ein weiterer Einsatzbereich besteht als Zusatz zu Gießereihilfsstoffen. Bei verschiedenen Gußverfahren werden Kerne benötigt, die aus Bindemittel-versetzten Sänden hergestellt werden. Als Bindemittel wird heute überwiegend Bentonit eingesetzt, das mit modifizierten Stärken, meist Quellstärken, versetzt ist. Zweck des Stärkezusatzes ist die Erhöhung der Fließfestigkeit sowie die Verbesserung der Bindefestigkeit. Darüber hinaus können die Quellstärken weitere produktionstechnische Anforderungen, wie im kalten Wasser dispergierbar, rehydratisierbar, gut in Sand mischbar und hohes Wasserbindungsvermögen, aufweisen.

#### 2.11. Einsatz in der Kautschukindustrie

In der Kautschukindustrie wird Stärke zur Verbesserung der technischen und optischen Qualität eingesetzt. Gründe sind dabei die Verbesserung des Oberflächenglanzes, die Verbesserung des Griffs und des Aussehens, dafür wird Stärke vor der Kaltvulkanisation auf die klebrigen gummierten Flächen von Kautschukstoffen gestreut, sowie die Verbesserung der Bedruckbarkeit des Kautschuks.

#### 2.12. Herstellung von Lederersatzstoffen

Eine weitere Absatzmöglichkeit von modifizierten Stärken besteht bei der Herstellung von Lederersatzstoffen.

### 2.13. Stärke in synthetischen Polymeren.

Auf dem Kunststoffsektor zeichnen sich folgende Einsatzgebiete ab: die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in den Verarbeitungsprozess (Stärke ist nur Füllstoff, es besteht keine direkte Bindung zwischen synthetischem Polymer und Stärke) oder alternativ die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in die Herstellung von Polymeren (Stärke und Polymer gehen eine feste Bindung ein).

Die Verwendung von Stärke als reinem Füllstoff ist verglichen mit den anderen Stoffen wie Talkum nicht wettbewerbsfähig. Anders sieht es aus, wenn die spezifischen Stärkeeigenschaften zum Tragen kommen und hierdurch das Eigenschaftsprofil der Endprodukte deutlich verändert wird. Ein Beispiel hierfür ist die Anwendung von Stärkeprodukten bei der Verarbeitung von Thermoplasten, wie Polyäthylen. Hierbei werden die Stärke und das synthetische Polymer durch Koexpression im Verhältnis von 1 : 1 zu einem 'master batch' kombiniert, aus dem mit granuliertem Polyäthylen unter Anwendung herkömmlicher Verfahrenstechniken diverse Produkte hergestellt werden. Durch die Einbindung von Stärke in Polyäthylenfolien kann eine erhöhte Stoffdurchlässigkeit bei Hohlkörpern, eine verbesserte Wasserdampfdurchlässigkeit, ein verbessertes Antistatikverhalten, ein verbessertes Antiblockverhalten sowie eine verbesserte Bedruckbarkeit mit wässrigen Farben erreicht werden. Gegenwärtige Nachteile betreffen die ungenügende Transparenz, die verringerte Zugfestigkeit sowie eine verringerte Dehnbarkeit.

Eine andere Möglichkeit ist die Anwendung von Stärke in Polyurethanschäumen. Mit der Adaption der Stärkederivate sowie durch die verfahrenstechnische Optimierung ist es möglich, die Reaktion zwischen synthetischen Polymeren und den Hydroxygruppen der Stärken gezielt zu steuern. Das Ergebnis sind Polyurethanfolien, die durch die Anwendung von Stärke folgende Eigenschaftsprofile erhalten: eine Verringerung des Wärmeausdehnungskoeffizienten, Verringerung des Schrumpfverhaltens, Verbesserung des Druck/Spannungsverhaltens, Zunahme der

Wasserdampfdurchlässigkeit ohne Veränderung der Wasseraufnahme, Verringerung der Entflammbarkeit und der Aufrißdichte, kein Abtropfen brennbarer Teile, Halogenfreiheit und verminderte Alterung. Nachteile, die gegenwärtig noch vorhanden sind, sind verringerte Druckfestigkeit sowie eine verringerte Schlagfestigkeit.

Die Produktentwicklung beschränkt sich inzwischen nicht mehr nur auf Folien. Auch feste Kunststoffprodukte, wie Töpfe, Platten und Schalen, sind mit einem Stärkegehalt von über 50 % herzustellen. Des weiteren sind Stärke/Polymermischungen günstig zu beurteilen, da sie eine sehr viel höhere biologische Abbaubarkeit aufweisen.

Außerordentliche Bedeutung haben weiterhin auf Grund ihres extremen Wasserbindungsvermögen Stärkepfropfpolymerisate gewonnen. Dies sind Produkte mit einem Rückgrat aus Stärke und einer nach dem Prinzip des Radikalkettenmechanismus aufgepfropften Seitengitters eines synthetischen Monomers. Die heute verfügbaren Stärkepfropfpolymerisate zeichnen sich durch ein besseres Binde- und Rückhaltevermögen von bis zu 1000 g Wasser pro g Stärke bei hoher Viskosität aus. Die Anwendungsbereiche für diese Superabsorber haben sich in den letzten Jahren stark ausgeweitet und liegen im Hygienebereich mit Produkten Windeln und Unterlagen sowie im landwirtschaftlichen Sektor, z.B. bei Saatgutpillierungen.

Entscheidend für den Einsatz von neuen, gentechnisch veränderten Stärken sind zum einen die Struktur, Wassergehalt, Proteingehalt, Lipidgehalt, Fasergehalt, Asche/Phosphatgehalt, Amylose/Amylopektinverhältnis, Molmassenverteilung, Verzweigungsgrad, Korngröße und -form sowie Kristallisation, zum anderen auch die Eigenschaften, die in folgende Merkmale münden: Fließ- und Sorptionsverhalten, Verkleisterungstemperatur, Viskosität, Dickungsleistung, Löslichkeit, Kleisterstruktur, Transparenz, Hitze-, Scher- und Säurestabilität, Retrogradationsneigung, Gelbildung, Gefrier/Taustabilität, Komplexbildung, Jodbindung, Filmbildung, Klebekraft,

Enzymstabilität, Verdaulichkeit und Reaktivität.

Die Erzeugung modifizierter Stärken mittels gentechnischer Verfahren kann zu einer Veränderung der Eigenschaften der z.B. aus der Pflanze gewonnenen Stärke dahingehend verändern, daß weitere Modifikationen mittels chemischer oder physikalischer Veränderungen nicht mehr notwendig erscheinen. Zum anderen können jedoch auch durch gentechnische Verfahren veränderte Stärken weiteren chemischen Modifikationen unterworfen werden, was zu weiteren Verbesserungen der Qualität für bestimmte der oben beschriebenen Einsatzgebiete führt. Diese chemischen Modifikationen sind grundsätzlich bekannt. Insbesondere handelt es sich dabei um Modifikationen durch Hitze- und Druckbehandlung, Behandlung mit organischen oder anorganischen Säuren, enzymatische Behandlung, Oxidationen und Veresterungen, welche z.B. zur Entstehung von Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- und Citratstärken führen. Desweiteren können ein- oder mehrwertige Alkohole in Gegenwart starker Säuren zur Erzeugung von Stärkeethern eingesetzt werden, so daß Stärke-Alkylether, O-Allylether, Hydroxylalkylether, O-Carboxymethylether, N-haltige Stärkeether, P-haltige Stärkeether, S-haltige Stärkeether, vernetzte Stärken oder Stärke-Pfropf-Polymerisate resultieren.

Eine Verwendung der erfindungsgemäßen Stärken liegt in der industriellen Anwendung, vorzugsweise für Lebensmittel oder der Herstellung von Verpackungsmaterialien und Einwegartikeln.

Die nachfolgenden Beispiele dienen der Illustrierung der Erfindung und stellen in keiner Weise eine Einschränkung dar.

Verwendete Abkürzungen:

BE	branching enzyme (Verzweigungsenzym)
bp	Basenpaar

<b>IPTG</b>	Isopropyl $\beta$ -D-Thiogalacto-Pyranosid
<b>SS</b>	soluble starch synthase (lösliche Stärkesynthase)
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid

In den Beispielen verwendete Medien und Lösungen:

<b>20 x SSC</b>	175,3 g NaCl 88,2 g Natrium-Citrat ad 1000 ml mit ddH <sub>2</sub> O pH 7,0 mit 10 N NaOH
<b>Puffer A</b>	50 mM Tris-HCl pH 8,0 2,5 mM DTT 2 mM EDTA 0,4 mM PMSF 10% Glycerin 0,1 % Natriumdithionit
<b>Puffer B</b>	50 mM Tris-HCl pH 7,6 2,5 mM DTT 2 mM EDTA
<b>Puffer C</b>	0,5 M Natriumcitrat pH 7,6 50 mM Tris-HCl pH 7,6 2,5 mM DTT 2 mM EDTA
<b>10 x TBS</b>	0,2 M Tris-HCl pH 7,5 5,0 M NaCl

10 x TBST	10 x TBS 0,1 % (v/v) Tween 20
Elutionspuffer	25 mM Tris pH 8,3 250 mM Glycin
Dialysepuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,0 50 mM NaCl 2 mM EDTA 14,7 mM $\beta$ -Mercaptoethanol 0,5 mM PMSF
Proteinpuffer	50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2 10 mM EDTA 0,5 mM PMSF 14,7 mM $\beta$ -Mercaptoethanol

#### Beschreibung der Abbildungen:

Fig. 1 stellt ein schematisches RVA-Temperaturprofil (Viskosität vs. Zeit [min]) dar mit den viskosimetrischen Parametern T = Verkleisterungstemperatur, Temperatur zum Zeitpunkt des Verkleisterungsbeginns; Max bezeichnet die maximale Viskosität; Min bezeichnet die minimale Viskosität; Fin bezeichnet die Viskosität am Ende der Messung; Set ist die Differenz ( $\Delta$ ) aus Min und Fin (Setback).

In den Beispielen wurden die folgenden Methoden verwendet:

#### 1. Klonierungsverfahren

Zur Klonierung in *E. coli* wurde der Vektor pBluescript II SK (Stratagene) verwendet.

Für die Pflanzentransformation wurden die Genkonstruktionen in den binären Vektor pBinAR Hyg (Höfgen & Willmitzer, 1990; Plant Sci. 66:221-230) und pBinB33-Hyg kloniert.

## 2. Bakterienstämme und Plasmide

Für den Bluescript-Vektor p Bluescript II KS (Stratagene) und für die pBinAR Hyg- und pBinB33 Hyg-Konstrukte wurde der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburgh, USA) verwendet. Für die *in vivo excision* wurde der *E. coli*-Stamm XL1-Blue verwendet.

### pBinAR

Das Plasmid pBinAR ist ein Derivat des binären Vektorplasmids pBin19 (Bevan, 1984, Nucl. Acid Res. 12:8711-8721), das folgendermaßen konstruiert wurde: Ein 529 bp langes Fragment, das die Nukleotide 6909-7437 des 35S-Promotor des Blumenkohl-Mosaik-Virus umfaßt, wurde als EcoRI/KpnI-Fragment aus dem Plasmid pDH51 (Pietrzak et al., 1986) isoliert und zwischen die EcoRI- und KpnI-Schnittstellen des Polylinkers von pUC18 ligiert und wurde Plasmid pUC18-35S bezeichnet. Aus dem Plasmid pAGV40 (Herrera-Estrella et al., 1983) wurde mit Hilfe der Restriktionsendonucleasen HindIII und PvuII ein 192 bp langes Fragment isoliert, DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al, 1984, EMBO J. :835-846) umfaßt (Nukleotide 11749-11939). Nach Addition von SphI-Linkern an die PvuII-Schnittstelle wurde das Fragment zwischen die SphI- und HindIII-Schnittstellen von pUC18-35S ligiert und wurde Plasmid pA7 bezeichnet. Desweiteren wurde der gesamte Polylinker enthaltend den 35S-Promotor und ocs-Terminator mit EcoRI und HindIII herausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen pBin19 ligiert. Dabei entstand der pflanzliche Expressionsvektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1990).

### pBinB33

Der Promotor des Patatin Gens B33 aus *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa et al., 1989) wurde als Dral-Fragment (Nukleotide -1512 - +14) in den mit Sst I

geschnittenen Vektor pUC19, dessen Enden mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase geglättet worden waren, ligiert. Daraus entstand das Plasmid pUC19-B33. Aus diesem Plasmid wurde der B33-Promotor mit EcoRI und SmaI herausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pBinAR ligiert. Hieraus entstand der pflanzliche Expressionsvektor pBinB33.

#### pBinAR-Hyg

Ausgehend vom Plasmid pA7 (vgl. Beschreibung des Vektors pBinAR) wurde das EcoRI-HindIII Fragment umfassend den 35S-Promotor, den ocs-Terminator sowie den zwischen 35S-Promotor und ocs-Terminator gelegenen Teil des Polylinker in das entsprechend geschnittene pBin-Hyg Plasmid gesetzt.

#### pBinB33-Hyg

Ausgehend vom Plasmid pBinB33 wurde das EcoRI-HindIII Fragment umfassend den B33-Promotor, einen Teil des Polylinkers sowie den ocs-Terminator herausgeschnittenen und in den entsprechend geschnittenen Vektor pBin-Hyg ligiert. Hieraus entstand der pflanzliche Expressionsvektor pBinB33-Hyg.

### 3. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Der Transfer der DNA erfolgte durch direkte Transformation nach der Methode von Höfgen&Willmitzer (1988, Nucleic Acids Res. 16:9877). Die Plasmid-DNA transformierter Agrobakterien wurde nach der Methode von Birnboim&Doly (1979, Nucleic Acids Res. 7:1513-1523) isoliert und nach geeigneter Restriktionsspaltung gelelektrophoretisch analysiert.

### 4. Transformation von Kartoffeln

Die Transformation der Plasmide in die Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* L.cv. Desiree, Vereinigte Saatzuchten eG, Ebstorf) wurde mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens*-Stammes C58C1 durchgeführt (Dietze et al. (1995) in Gene Transfer to Plants. S. 24-29, eds.: Potrykus, I. and Spangenberg, G., Springer Verlag, Deblaere



et al., 1985, Nucl. Acids Res. 13:4777-4788).

Zehn kleine mit dem Skalpell verwundete Blätter einer Kartoffel-Sterilkultur wurden in 10 ml MS-Medium (Murashige&Skoog (1962) Physiol. Plant. 15: 473) mit 2% Saccharose gelegt, welches 50 ml einer unter Selektion gewachsenen *Agrobacterium tumefaciens*-Übernachtskultur enthielt. Nach 3-5 minütigem, leichtem Schütteln erfolgte eine weitere Inkubation für 2 Tage im Dunkeln. Daraufhin wurden die Blätter zur Kallusinduktion auf MS-Medium mit 1,6% Glukose, 5 mg/l Naphthylessigsäure, 0,2 mg/l Benzylaminopurin, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin, und 0,80.% Bacto Agar gelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei 25°C und 3000 Lux wurden die Blätter zur Sproßinduktion auf MS-Medium mit 1,6% Glukose, 1,4 mg/l Zeatinribose, 20 mg/l Naphthylessigsäure, 20 mg/l Giberellinsäure, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin, und 0,80.% Bacto Agar gelegt.

#### 5. Pflanzenhaltung

Kartoffelpflanzen wurden im Gewächshaus unter folgenden Bedingungen gehalten:

Lichtperiode	16 h bei 25000 Lux und 22°C
Dunkelperiode	8 h bei 15°C
Luftfeuchte	60 %

#### 6. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radiokative Markierung von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe eines DNA-Random Primer Labelling Kits der Firma Boehringer Mannheim (Deutschland) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### 7. Bestimmung der Stärkesynthase-Aktivität

Die Bestimmung der Stärkesynthaseaktivität erfolgte durch Bestimmung des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Glukose aus ADP [ $^{14}\text{C}$ -Glukose] in ein in Methanol/KCl unlösliches Produkt wie beschrieben in Denyer & Smith, 1992, Planta 186:609-617.

#### 8. Nachweis von löslichen Stärkesynthasen im nativen Gel

Zum Nachweis der Aktivität löslicher Stärkesynthasen durch nicht-denaturierende Gelelektrophorese wurden Gewebeproben von Kartoffelknollen in 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 2 mM DTT, 2,5 mM EDTA, 10 % Glycerin und 0,4 mM PMSF aufgeschlossen. Die Elektrophorese wurde in einer MiniProtean II Kammer (BioRAD) durchgeführt. Die Monomerkonzentration der 1,5 mm dicken Gele war 7,5 % (w/v), als Gel- und Laufpuffer diente 25 mM Tris-Glycin pH 8,4. Gleiche Mengen an Proteinextrakt wurden aufgetragen und für 2 h bei 10 mA je Gel aufgetrennt.

Anschließend erfolgte die Inkubation der Aktivitäts-Gele in 50 mM Tricine-NaOH pH 8,5, 25 mM Kaliumacetat, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM ADP-Glukose, 0,1 % (w/v) Amylopektin und 0,5 M Natriumcitrat. Gebildete Glukane wurden mit Lugolscher Lösung angefärbt.

#### 9. Stärkeanalytik

Die von den transgenen Kartoffelpflanzen gebildete Stärke wurde durch folgende Methoden charakterisiert:

##### a) Bestimmung des Amylose/Amylopektinverhältnisses in Stärke aus Kartoffelpflanzen

Stärke wurde nach Standardmethoden aus Kartoffelpflanzen isoliert und das Verhältnis Amylose zu Amylopektin nach der von Hovenkamp-Hermelink et al. beschriebenen Methode (Potato Research 31 (1988) 241-246) bestimmt.

##### b) Bestimmung des Phosphatgehaltes

In der Kartoffelstärke können einige Glucoseeinheiten an den Kohlenstoffatomen der Position C2, C3 und C6 phosphoryliert sein. Zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrades an der C6-Position der Glucose wurden 100 mg Stärke in 1 ml 0,7 M HCl für 4 Stunden bei 95°C hydrolysiert (Nielsen et. al. (1994) Plant Physiol. 105: 111-117). Nach Neutralisation mit 0,7 M KOH wurden zur Glucose-6-phosphat-Bestimmung 50 ml des Hydrolysats einem optisch-enzymatischen Test

unterzogen. Die Änderung der Absorption des Testansatzes (100 mM Imidazol/HCl; 10 mM  $MgCl_2$ ; 0,4 mM NAD; 2 U Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides*; 30°C) wurde bei 334 nm verfolgt.

Die Bestimmung des Gesamtphosphats erfolgte wie in Ames, 1996, Methods in Enzymology VIII, 115-118 beschrieben.

c) Analyse der Seitenketten des Amylopektins

Zur Analyse der Verteilung und Länge der Seitenketten in den Stärkeproben wurde 1 ml einer 0,1 %igen Stärkelösung mit 0,4 U Isoamylase (Megazyme International Ireland Ltd., Bray, Ireland) über Nacht bei 37°C in 100 mM Na-citrat-Puffer, pH 3,5 verdaut.

Die weitere Analyse erfolgte, sofern nicht anders erwähnt, entsprechend den Angaben von Tomlinson et al., (1997), Plant J. 11:31-47.

d) Korngrößenbestimmung

Die Korngrößenbestimmung wurde mit einem Fotosedimentometer des Typs "Lumosed" der Firma Retsch GmbH, Deutschland, durchgeführt. Hierfür wurden 0.2 g Stärke in ca. 150 ml Wasser suspendiert und sofort vermessen. Das vom Hersteller mitgelieferte Programm berechnete den mittleren Durchmesser der Stärkekörner auf der Annahme einer durchschnittlichen Dichte der Stärke von 1,5 g/l.

e) Verkleisterungseigenschaften

Die Verkleisterungs- bzw. Viskositätseigenschaften der Stärke wurden mit einem Viskograph E der Firma Brabender oHG, Deutschland, oder mit einem Rapid Visco Analyser, Newport Scientific Pty Ltd, Investment Support Group, Warriewood NSW 2102, Australien, aufgezeichnet. Bei Verwendung des Viskographen E wurde eine Suspension von 30 g Stärke in 450 ml Wasser folgendem Heizprogramm unterzogen:

aufheizen von 50°C auf 96°C mit 3°/min., 30 Minuten konstant halten, abkühlen auf 30°C mit 3°/min. und abermals 30 Minuten konstant halten. Das Temperaturprofil lieferte charakteristische Verkleisterungseigenschaften.

Bei der Messung mittels des Rapid Visco Analysers (RVA) wurde eine Suspension von 2 g Stärke in 25 ml Wasser folgendem Heizprogramm unterzogen: 60 s bei 50°C suspendieren, aufheizen von 50°C auf 95°C mit 12°/min., 2,5 Minuten konstant halten, abkühlen auf 50°C mit 12°C/min. und abermals 2 Minuten konstant halten. Das RVA-Temperaturprofil lieferte die viskosimetrischen Parameter der untersuchten Stärken für die maximale (Max) und Endviskosität (Fin), die Verkleisterungstemperatur (T), die nach der maximalen Viskosität auftretende minimale Viskosität (Min) sowie die Differenz aus minimaler und Endviskosität (Setback, Set) (vgl. Tabelle 1 und Fig. 1).

#### f) Bestimmung der Gelfestigkeit

Zur Bestimmung der Gelfestigkeit mittels eines Texture Analyser wurden 2 g Stärke in 25 ml Wasser verkleistert (vgl. Messung mittels RVA) und anschließend 24 h lang bei 25°C luftdicht verschlossen gelagert. Die Proben wurden unter der Sonde (runder Stempel) eines Texture Analysers TA-XT2 (Stable Micro Systems) fixiert und die Gelfestigkeit mit folgenden Parameter-Einstellungen bestimmt:

Test-Geschwindigkeit	0,5 mm
Eindringtiefe	7 mm
Kontaktfläche (des Stempels)	113 mm <sup>2</sup>
Druck/Kontaktfläche	2 g

#### 10. Bestimmung von Glucose, Fructose und Saccharose

Zur Bestimmung des Glucose-, Fructose- bzw. Saccharosegehalts wurden kleine Knollenstücke (Durchmesser ca. 10 mm) von Kartoffelknollen in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend für 30 min bei 80°C in 0,5 ml 10 mM HEPES, pH 7,5;

80 % (v/v) Ethanol extrahiert. Der Überstand, der die löslichen Bestandteile enthält, wurde abgenommen und das Volumen bestimmt. Der Überstand wurde zur Bestimmung der Menge an löslichen Zuckern verwendet. Die quantitative Bestimmung von löslicher Glucose, Fructose und Saccharose wurde in einem Ansatz mit folgender Zusammensetzung durchgeführt.

100,0	mM Imidazol/HCl, pH 6,9
1,5	mM MgCl <sub>2</sub>
0,5	mM NADP <sup>+</sup>
1,3	mM ATP
10-50	µl Probe
1,0	U Glucose-6-Phosphatdehydrogenase aus Hefe

Der Ansatz wurde 5 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung der Zucker erfolgt anschließend photometrisch durch Messung der Absorption bei 340 nm nach aufeinanderfolgender Zugabe von

1,0 Einheiten Hexokinase aus Hefe (zur Bestimmung von Glucose),  
1,0 Einheiten Phosphoglucosomerase aus Hefe (zur Bestimmung von Fructose) und  
1,0 Einheiten Invertase aus Hefe (zur Bestimmung von Saccharose).

#### Ausführungsbeispiele:

##### Beispiel 1: Isolierung eines cDNA-Fragments kodierend für $\beta$ -Amylase aus Kartoffel

Etwa  $6 \times 10^6$  Plaque forming Units (pfU's) einer Knollen-spezifischen cDNA-Bibliothek aus Kartoffel ( $\lambda$ ZAP II, Stratagene) wurden nach Herstellerangaben (Stratagene) in vivo excisiert und ein Teil des Phagmidstocks zur Transfektion von E.coli XL1-MRF-Zellen (nach Herstellerangaben) verwendet. Plasmid-DNA von etwa  $5 \times 10^5$  solcher E.coli-Transformanten wurde präpariert (Sambrook et al., 1989, loc.cit.) und zur Transformation nach der Elektroporationsmethode (BioRAD, nach Angaben des Herstellers) von Zellen des E.coli-Stammes KV832/pACAG (Abel, G., 1995,

Dissertation am FB Biologie der FU Berlin) verwendet.

Die KV832/pACAG-Transformanden wurden auf YT-Medium (5g/l NaCl, 8g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt) mit 1 % Glukose und 1 mM IPTG bei 37°C kultiviert. Zur Selektion auf das Vorhandensein des Plasmids pACAG enthielt das Medium 10 mg/l Chloramphenicol. Zur Selektion auf positive Transformanden enthielt das Medium 100 mg/l Ampicillin.

Nach etwa 14 Stunden Wachstum wurden die Kolonien der transformierten Zellen über Jod-Dampf gefärbt. Plasmid-DNA deutlich schwach gefärbter Kolonien wurde nach Birnboim & Doly (1979) präpariert und zur Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  (Sambrook et al., 1989, loc.cit.) verwendet. Plasmid DNA dieser Transformanden wurde zur DNA-Sequenzierung eingesetzt und als Seq. ID Nr. 1 identifiziert.

Das auf diese Weise selektierte Plasmid wurde am 24.07.98 unter der Nummer DSM 12348 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen in Braunschweig, BRD, hinterlegt und enthält zwischen dem CAMV 35S-Promotor und dem ocs-Terminator ein ca. 1300 bp langes Asp718/BamH1-Fragment der als Seq. ID Nr. 1 dargestellten Nukleotidsequenz, kodierend für eine  $\beta$ -Amylase aus *Solanum tuberosum*.

**Beispiel 2: Herstellung des Plasmids p35S $\alpha$ SSI-Hyg**

Ein 1831 bp langes Asp718/XbaI-Fragment, enthaltend eine partielle cDNA kodierend für die SSS I aus Kartoffel (Abel, G., (1995) Dissertation, Freie Universität Berlin), wurde in "antisense"-Orientierung bezüglich des 35S-Promotors zwischen die Asp718- und XbaI-Schnittstelle des Vektors pBinAR-Hyg eingeführt.

**Beispiel 3: Herstellung des Plasmids p35S-SSI-Kan**

Ein 2384 bp langes EcoRI-Fragment, enthaltend eine cDNA kodierend für SS I aus

Kartoffel, (Abel 1995, loc.cit.) wurde geglättet und in dem mit SmaI vorgeschnittenen Vektor pBinAR in "sense"-Orientierung bezüglich des 35S-Promotors eingeführt.

**Beispiel 4: Herstellung des Plasmids p35S $\alpha$ SSII-Kan**

Ein 1959 bp langes SmaI/Asp718-Fragment, enthaltend eine partielle cDNA kodierend für die SS II aus Kartoffel (Abel, 1995, dort als GBSS II bezeichnet), wurde geglättet und in "antisense"-Orientierung bezüglich des 35S-Promotors in die SmaI-Schnittstelle des Vektors pBinAR eingeführt.

**Beispiel 5: Herstellung des Plasmids pB33-SSII-Hyg**

Ein 2619 bp langes SmaI/Sall Fragment, enthaltend eine cDNA kodierend für die SS II aus Kartoffel (Abel, 1995, loc.cit.), wurde in den mit SmaI und Sall vorgeschnittenen Vektor pBinB33-Hyg in "sense"-Orientierung bezüglich des B33-Promotors eingeführt.

**Beispiel 6: Herstellung des Plasmids p35S $\alpha$ SSIII-Hyg**

Ein 4212 bp langes Asp718/XbaI-Fragment, enthaltend eine cDNA kodierend für die SS III aus Kartoffel (Abel et al., 1996, Plant J. 10(6):981-991), wurde in "antisense"-Orientierung bezüglich des 35S-Promotors zwischen die Asp718- und die XbaI-Schnittstelle des Vektors pBinAR-Hyg eingeführt.

**Beispiel 7: Herstellung des Plasmids p35S-SSIII-Kan**

Ein 4191 bp langes EcoRI-Fragment, enthaltend eine cDNA kodierend für SS III aus Kartoffel (Abel et al., 1996, loc.cit.), wurde geglättet und in "sense"-Orientierung

bezüglich des 35S-Promotors in die SmaI-Schnittstelle des Vektors pBinAR eingeführt.

**Beispiel 8: Herstellung des Plasmids pB33 $\alpha$ BE $\alpha$ SSIII-Kan**

Ein 1650 bp langes HindII-Fragment, welches eine partielle cDNA kodierend für das BE-Enzym aus Kartoffel enthält (Kossmann et al., 1991, Mol. & Gen. Genetics 230(1-2):39-44), wurde geglättet und in "antisense"-Orientierung bezüglich des B33 Promotors in den mit SmaI vorgeschrittenen Vektor pBinB33 eingeführt. Das erhaltene Plasmid wurde mit BamHI aufgeschnitten. In die Schnittstelle wurde ein 1362 Bp langes BamHI-Fragment, enthaltend eine partielle cDNA kodierend für das SS III-Enzym aus Kartoffel (Abel et al., 1996, loc.cit.), ebenfalls in "antisense"-Orientierung bezüglich des B33-Promotors eingeführt.

**Beispiel 9: Herstellung des Plasmids p35S $\alpha$ SSII- $\alpha$ SSIII-Kan**

Ein 1546 bp langes EcoRV/HincII-Fragment, enthaltend eine partielle cDNA kodierend für die SS II aus Kartoffel (Abel, 1995, loc.cit.), wurde in den EcoRV/HincII-geschnittenen Vektor pBluescript II KS kloniert und anschließend über einen Asp718/BamHI-Verdau wieder herausgeschnitten und in den ebenso verdauten Vektor pBinAR in "antisense"-Orientierung bezüglich des 35S-Promotors eingefügt. Danach wurde ein 1356 Bp langes BamHI-Fragment, enthaltend eine partielle cDNA kodierend für die SS III aus Kartoffel (Abel et al., 1996, loc.cit.), ebenfalls in "antisense"-Orientierung bezüglich des 35S-Promotors in die BamHI-Schnittstelle des Vektors pBinAR- $\alpha$ SSII eingeführt.

**Beispiel 10: Herstellung des Plasmids pB33 $\alpha$ SSI $\alpha$ SSIII-Kan**

Ein 2384 bp langes EcoRI-Fragment enthaltend eine cDNA kodierend für SS I aus Kartoffel (Abel, 1995, loc.cit.) wurde geglättet und in die SmaI-Schnittstelle des



pBinB33-Vektors in "antisense"-Orientierung bezüglich des B33-Promotors kloniert. Ein 1362 Bp langes BamHI-Fragment enthaltend eine partielle cDNA kodierend für die SS III aus Kartoffel (Abel et al., 1996, loc.cit.) wurde in die BamHI-Schnittstelle des resultierenden Vektors ebenfalls in "antisense"-Orientierung bezüglich des B33-Promotors eingeführt.

**Beispiel 11: Herstellung des Plasmids p35S $\alpha$ SSII-Hyg**

Ein 1959 bp langes SmaI/Asp718-Fragment, enthaltend eine partielle cDNA kodierend für die SS II (Abel, 1995, loc.cit.), wurde geglättet und in "antisense"-Orientierung bezüglich des 35S-Promotors in die SmaI-Schnittstelle des pBinAR-Hyg-Vektors eingeführt.

**Beispiel 12: Einführung der Plasmide in das Genom von Kartoffelzellen**

Die in Beispiel 1 bis 11 aufgeführten Plasmide wurden einzeln und/oder aufeinanderfolgend in Agrobakterien transferiert, mit deren Hilfe die Transformation von Kartoffelzellen wie oben beschrieben vorgenommen wurde. Aus den transformierten Pflanzenzellen wurden anschließend ganze Pflanzen regeneriert.

**Beispiel 13: Charakterisierung der physiko-chemischen Eigenschaften der modifizierten Stärken**


Als Ergebnis der Transformation zeigten die transgenen Kartoffelpflanzen eine Veränderung der physiko-chemischen Eigenschaften der von ihnen synthetisierten Stärken. Die von diesen Pflanzen gebildete Stärke unterscheidet sich z.B. von in Wildtyppflanzen synthetisierter Stärke in ihrem Phosphat- oder Amylosegehalt, den mittels RVA bestimmten Viskositäts- oder Verkleisterungseigenschaften sowie ihrem chromatographischen Verhalten.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE  
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHRENHöchst Schering  
AgrEvo GmbH

INTERNATIONALES FORMBLATT

65926 Frankfurt am Main

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

<b>I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS</b>	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: <b>St-<math>\beta</math>-Amy</b>	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER:  <b>DSM 12348</b>
<b>II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG</b>	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde  <input type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung  eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
<b>III. EINGANG UND ANNAHME</b>	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am <b>1998-07-24</b> (Datum der Ersthinterlegung) <sup>1</sup> eingegangen ist.	
<b>IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG</b>	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
<b>V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE</b>	
Name: <b>DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</b>  Anschrift: <b>Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</b>	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:    Datum: <b>1998-07-30</b>

<sup>1</sup> Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

**Patentansprüche:**

1. Nukleinsäuremolekül, codierend ein Protein mit der Funktion einer  $\beta$ -Amylase aus Kartoffel, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
  - a) Nukleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die unter Seq ID NO. 2 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt oder deren Derivate oder Teile,
  - b) Nukleinsäuremolekülen, die die unter Seq ID No. 1 dargestellte Nucleotidsequenz oder deren Derivate oder Teile umfassen oder eine korrespondierende Ribonucleotidsequenz;
  - c) Nukleinsäuremoleküle, die mit den unter (a) oder (b) genannten Nukleinsäuremolekülen hybridisieren, vorzugsweise spezifisch hybridisieren oder komplementär sind, und
  - d) Nukleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter (a), (b) oder (c) genannten Nukleinsäuremoleküle abweicht.
2. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül, enthaltend
  - a) ein Nukleinsäuremolekül codierend für ein Protein mit der Funktion einer  $\beta$ -Amylase aus Kartoffel gemäß Anspruch 1 und
  - b) ein oder mehrere Nukleotidsequenzen, die für ein Protein kodieren, ausgewählt aus der Gruppe A, bestehend aus Proteinen mit der Funktion von Verzweigungsenzymen, ADP-Glukose-Pyrophosphorylasen, Stärkekorn-gebundenen Stärkesynthasen, löslichen Stärkesynthasen, Entzweigungsenzymen, Disproportionierungsenzymen, plastidären Stärkephosphorylasen, R1- Enzymen, Amylasen, Glukosidasen, Teilen besagter Nukleotidsequenzen oder mit besagten Nukleotidsequenzen hybridisierende Nukleinsäuremoleküle.
3. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 2, das ein Desoxyribonukleinsäure-

Molekül ist.

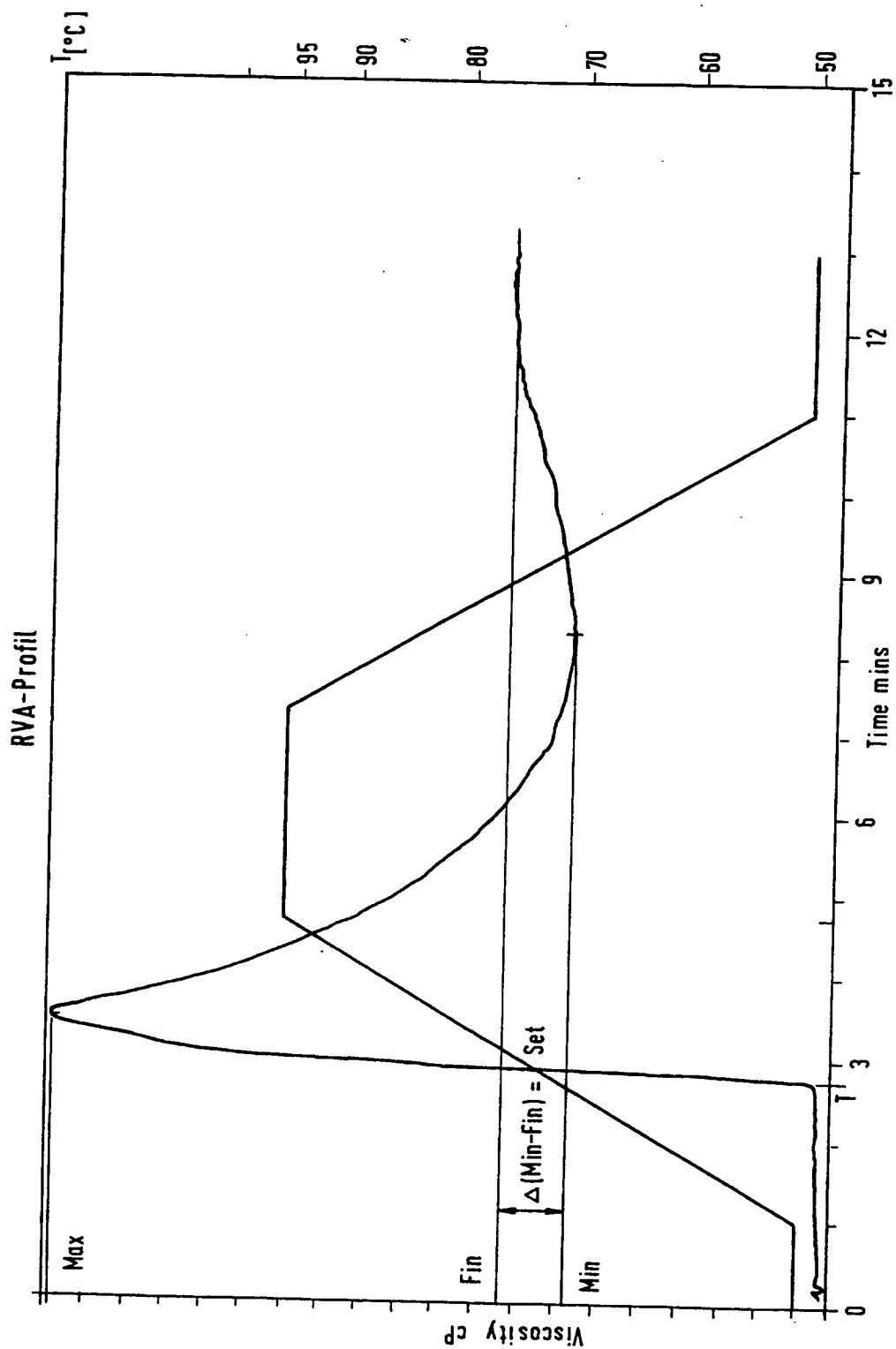
4. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 2, das ein cDNA-Molekül ist.
5. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, das ein Ribonukleinsäure-Molekül ist.
6. Nukleinsäuremolekül, das mit einem Nukleinsäuremolekül einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 hybridisiert, vorzugsweise spezifisch hybridisiert.
7. Vektor, enthaltend ein Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6.
8. Vektor, enthaltend ein Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleotidsequenz codierend für ein Protein mit der Funktion einer löslichen Stärkesynthase III oder Teile davon in sense- oder anti-sense-Richtung vorliegt.
9. Vektor, enthaltend ein Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleotidsequenz codierend für ein oder mehrere Proteine ausgewählt aus der Gruppe A oder Teile davon in sense- oder anti-sense-Richtung vorliegt.
10. Vektor, enthaltend ein Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleotidsequenz codierend für ein oder mehrere Proteine ausgewählt aus der Gruppe A teilweise in sense-Richtung und teilweise in anti-sense-Richtung vorliegt.
11. Vektor, enthaltend ein Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß es mit regulatorischen Elementen verknüpft ist, die die Transkription und Synthese einer RNA, die ggf.

translatierbar ist, in einer pro- oder eukaryontischen Zelle gewährleisten.

12. Wirtszelle, die mit einem Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-6 oder einem Vektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 7-11 transformiert ist oder von einer solchen Zelle abstammt.
13. Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanzenzelle, die eine modifizierte Stärke synthetisiert, dadurch gekennzeichnet, daß ein Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-6, oder ein Vektors nach Anspruch 7-11 in das Genom einer Pflanzenzelle integriert wird.
14. Pflanzenzelle, erhältlich nach einem Verfahren gemäß Anspruch 13.
15. Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze, die eine modifizierte Stärke synthetisiert, dadurch gekennzeichnet, daß aus einer Zelle nach Anspruch 14 eine vollständige Pflanze regeneriert wird.
16. Pflanze, enthaltend eine Pflanzenzelle nach Anspruch 14.
17. Pflanze nach Anspruch 16, die eine Nutzpflanze ist.
18. Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 17, die eine stärkepeichernde Pflanze ist.
19. Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 18, die eine Weizen-, Mais-, Kartoffel- oder Reispflanze ist.
20. Vermehrungsmaterial einer Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 19.

21. Verfahren zur Herstellung von Stärke nach einem an sich bekannten Verfahren, dadurch gekennzeichnet, daß Pflanzenzellen gemäß Anspruch 14, Pflanzen nach einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 19 oder Vermehrungsmaterial nach Anspruch 20 in das Verfahren integriert werden.
22. Stärke, erhältlich aus einer Zelle gemäß Anspruch 12 oder 14, einer Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 19, aus Vermehrungsmaterial nach Anspruch 20 oder einem Verfahren nach Anspruch 21.
23. Verwendung der Stärke nach Anspruch 22 im industriellen Bereich, vorzugsweise zur Herstellung von Lebensmitteln, Verpackungsmaterialien oder Einwegartikeln.
24. Verwendung von Nukleinsäuremolekülen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-6 oder Vektoren nach einem oder mehreren der Ansprüche 7-11 zur Herstellung von transgenen Zellen, vorzugsweise bakteriellen oder pflanzlichen Zellen.
25. Verwendung von Pflanzenzellen gemäß Anspruch 14, Pflanzen nach einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 19 oder Vermehrungsmaterial nach Anspruch 20 zur Herstellung von Stärke.

1/1



## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Hoechst Schering AgrEvo GmbH

<120> Nukleinsäuremoleküle kodierend für eine  $\beta$ -Amylase,  
Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren,  
Verfahren zur Herstellung der Pflanzen, ihre Verwendung  
sowie die modifizierte Stärke

<130> AGR 1998/M 224

<150> DE 19836099.1

<151> 1998-07-31

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1950

<212> DNA

<213> S. tuberosum

<400> 1

```
attaatatta ttattatggc aatgagtctg ccacaccaga tcggtgcctt atcaggaaca 60
tcgctcacgg cggaaaccgg tggagtttca tgcgaagttc cggcgaaggg gagttcagct 120
acatcagcta tgtggagaac accgatgacg aatttaaaag tatcgggtaca aaaaacagga 180
actgaaattg acaggggtgc gccgtcgccg tcgccgccga tgagtccgat gatgggagga 240
ggaatgcggc cggatttatt agcgtgtcaa gcgttgatgg aagctcaggt agatgaggta 300
gttgagagag aatataaggt taggaattcg tcggagaaaag agaaaggagt tccggtgttt 360
gttatgatgc cgttggatag tgtgaaaatg gatcactactg tgaataggaa gaaggcgatg 420
aatgcgagtt tacaggcggt gaagagcgcc ggtgtggaag ggattatgat ggatgtgtgg 480
tggggatttg tggagagaga tgcgccggga gagtataatt ggggcggtta tgctgagctt 540
atggaaatgg cgaaaaaaca tggactcaa gttcaagctg tgatgtcttt ccatcaatgt 600
ggtggaaacg tcggtgattc ctgcacgatc cctcttccaa ggtgggttgt tgaggagatg 660
gagaaggatc cagatcttgc atacacagat cagtggggaa ggaggaattt tgaatatgta 720
```



tcgcttggtt gcgatacact tccagttctt aaaggaagga ctcctgtcca atgctattct 780  
 gatttcatga gaggggttag agatagattt gagaatctcc taggtgacac cattgtggaa 840  
 attcaagtcg ggatgggtcc agctggagag ctccgttacc catcctatcc ggaaaaagat 900  
 ggagtatgga aattccctgg aattggtgct ttccagtgtt atgacaagta catgatcagt 960  
 agcttacagg gtgcagcaga agcttttggt aagcctgaat ggggacacac cggccaacc 1020  
 gatgctggtc agtacaacaa ttggccagaa gataccaact ttttcaagaa ggaaggtggt 1080  
 ggatgggata gtcaatatgg ggagttcttc ctcaactggt attctgagat gcttttgaac 1140  
 catggtgaga ggatactgca atcagccaag gcgatattcg aggacaaggg tgtaagatt 1200  
 tcagttaaga ttgcaggtat tcaactggcag tatggaacaa ggtcccatgc ccctgagctg 1260  
 accgctggat actacaacac ccgtaaccga gatggttacc ttcccatcgc ccaaatgctt 1320  
 gcccgccacg gtgcagtttt caacttcaca tgtgttgaga tgcgtgacca cgagcagcca 1380  
 caagatgcac tatgtgcacc tgagaagttg gttaggcaag tggcttttagc aactcaggaa 1440  
 gctcaagttc cacttgctgg ggagaatgca ttgccacgat acgatgatta tgcacatgaa 1500  
 cagatccttc aagcatcctc attgaatata aacgatcaat caggtgatag agagatgtgc 1560  
 gcgtttacat atttgaggat gaatcctgac ctattccatc ctgataactg gaggcgattc 1620  
 gttgccttcg tgaagaaaat gaaagaagga aaagacgcaa acaaatgccg ggaacaagta 1680  
 gagagggagg cagagcattt cgtgcatata actcagccgt tagtgcaaga agctgcagct 1740  
 gccctcatgc actaagcaaa tggttgtcaa atagtactgt aattttgac ctttttagcta 1800  
 acatggagtt tttcaacatg ttacgaggat cttatagctc gttatcgctt ttcttatatg 1860  
 tttgtaaaac tgtccatcgt gtattttttc gaagttagac attatgtctt aatgaaatga 1920  
 tacataattc agtagtaaaa aaaaaaaaaa 1950

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 579

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; S. tuberosum

&lt;400&gt; 2

Met Ala Met Ser Leu Pro His Gln Ile Gly Ala Leu Ser Gly Thr Ser  
 1 5 10 15

Leu Thr Ala Glu Thr Gly Gly Val Ser Cys Glu Val Pro Ala Lys Gly  
 20 25 30

Ser Ser Ala Thr Ser Ala Met Trp Arg Thr Pro Met Thr Asn Leu Lys  
 35 40 45

Val Ser Val Gln Lys Thr Gly Thr Glu Ile Asp Arg Val Ser Pro Ser  
 50 55 60

Pro Ser Pro Pro Met Ser Pro Met Met Gly Gly Gly Met Arg Pro Asp  
 65 70 75 80

Leu Leu Ala Cys Gln Ala Leu Met Glu Ala Gln Val Asp Glu Val Val  
 85 90 95

Glu Arg Glu Tyr Lys Val Arg Asn Ser Ser Glu Lys Glu Lys Gly Val  
 100 105 110

Pro Val Phe Val Met Met Pro Leu Asp Ser Val Lys Met Asp His Thr  
 115 120 125

Val Asn Arg Lys Lys Ala Met Asn Ala Ser Leu Gln Ala Leu Lys Ser  
 130 135 140

Ala Gly Val Glu Gly Ile Met Met Asp Val Trp Trp Gly Leu Val Glu  
 145 150 155 160

Arg Asp Ala Pro Gly Glu Tyr Asn Trp Gly Gly Tyr Ala Glu Leu Met  
 165 170 175

Glu Met Ala Lys Lys His Gly Leu Lys Val Gln Ala Val Met Ser Phe  
 180 185 190

His Gln Cys Gly Gly Asn Val Gly Asp Ser Cys Thr Ile Pro Leu Pro  
 195 200 205

Arg Trp Val Val Glu Glu Met Glu Lys Asp Pro Asp Leu Ala Tyr Thr  
 210 215 220

Asp Gln Trp Gly Arg Arg Asn Phe Glu Tyr Val Ser Leu Gly Cys Asp

4

225	230	235	240
Thr Leu Pro Val Leu Lys Gly Arg Thr Pro Val Gln Cys Tyr Ser Asp			
245	250	255	
Phe Met Arg Gly Phe Arg Asp Arg Phe Glu Asn Leu Leu Gly Asp Thr			
260	265	270	
Ile Val Glu Ile Gln Val Gly Met Gly Pro Ala Gly Glu Leu Arg Tyr			
275	280	285	
Pro Ser Tyr Pro Glu Lys Asp Gly Val Trp Lys Phe Pro Gly Ile Gly			
290	295	300	
Ala Phe Gln Cys Tyr Asp Lys Tyr Met Ile Ser Ser Leu Gln Gly Ala			
305	310	315	320
Ala Glu Ala Phe Gly Lys Pro Glu Trp Gly His Thr Gly Pro Thr Asp			
325	330	335	
Ala Gly Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Glu Asp Thr Asn Phe Phe Lys Lys			
340	345	350	
Glu Gly Gly Gly Trp Asp Ser Gln Tyr Gly Glu Phe Phe Leu Thr Trp			
355	360	365	
Tyr Ser Glu Met Leu Leu Asn His Gly Glu Arg Ile Leu Gln Ser Ala			
370	375	380	
Lys Ala Ile Phe Glu Asp Lys Gly Val Lys Ile Ser Val Lys Ile Ala			
385	390	395	400
Gly Ile His Trp His Tyr Gly Thr Arg Ser His Ala Pro Glu Leu Thr			
405	410	415	
Ala Gly Tyr Tyr Asn Thr Arg Asn Arg Asp Gly Tyr Leu Pro Ile Ala			

420 425 430  
Gln Met Leu Ala Arg His Gly Ala Val Phe Asn Phe Thr Cys Val Glu  
435 440 445  
Met Arg Asp His Glu Gln Pro Gln Asp Ala Leu Cys Ala Pro Glu Lys  
450 455 460  
Leu Val Arg Gln Val Ala Leu Ala Thr Gln Glu Ala Gln Val Pro Leu  
465 470 475 480  
Ala Gly Glu Asn Ala Leu Pro Arg Tyr Asp Asp Tyr Ala His Glu Gln  
485 490 495  
Ile Leu Gln Ala Ser Ser Leu Asn Ile Asn Asp Gln Ser Gly Asp Arg  
500 505 510  
Glu Met Cys Ala Phe Thr Tyr Leu Arg Met Asn Pro Asp Leu Phe His  
515 520 525  
Pro Asp Asn Trp Arg Arg Phe Val Ala Phe Val Lys Lys Met Lys Glu  
530 535 540  
Gly Lys Asp Ala Asn Lys Cys Arg Glu Gln Val Glu Arg Glu Ala Glu  
545 550 555 560  
His Phe Val His Ile Thr Gln Pro Leu Val Gln Glu Ala Ala Ala Ala  
565 570 575  
Leu Met His

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No  
PCT/EP 99/05523

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12N15/82 C12N9/26 C12N15/54 A01H5/00 C08B30/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N A01H C08B		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YOSHIDA N ET AL: "A NUCLEAR GENE ENCODING BETA-AMYLASE OF SWEET POTATO" GENE, vol. 120, no. 2, page 255-259 XP000616567 ISSN: 0378-1119 the whole document	1,3-7, 11,12,24
X	DATABASE EMPLN 'Online! EMBL, Heidelberg, Germany AC AJ225087, ID VUA225087, 23 March 1998 (1998-03-23) BHULLAR S S: "Isolation and characterization of beta-amylase from cowpea (Vigna unguiculata)" XP002124966 abstract	1,3-7, 11,12,24
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  20 December 1999		Date of mailing of the international search report  11/01/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Oderwald, H

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 99/05523

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MITA S ET AL.: "Sugar-inducible expression of a gene for beta-amylase in <i>Arabidopsis thaliana</i> " PLANT PHYSIOLOGY, vol. 107, 1995, pages 895-904, XP002124965 the whole document	1,3-7, 12,24
A	WO 94 28149 A (MONSANTO CO ;BARRY GERARD FRANCIS (US); KISHORE GANESH MURTHY (US)) 8 December 1994 (1994-12-08) the whole document	2-4,6,7, 9-25
X	ABEL G J W ET AL.: "Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a novel 139 kDa starch synthase from potato ( <i>Solanum tuberosum</i> L.)" PLANT JOURNAL, vol. 10, no. 6, 1996, pages 981-991, XP002121809 the whole document	6-25
A		2-4
A	WO 92 05259 A (GIST BROCADES NV ;MOGEN INT (NL)) 2 April 1992 (1992-04-02) the whole document	1-25
A	WO 94 09144 A (ZENECA LTD) 28 April 1994 (1994-04-28) the whole document	1-25

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 99/05523

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
See Supplemental Sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 99/05523

## Continuation of Box I.2

Patent claims 2-4, 6, 7 and 9-25 relate to an excessively large number of possible nucleic acid molecules, methods and plants, of which only a small proportion is supported by the description as defined by PCT Art. 6 and/or can be considered as disclosed in the patent application as defined by PCT Art. 5. In the present case, the patent claims lack the necessary support and the patent application lacks the necessary disclosure to such an extent that a meaningful search covering the entire range of protection sought for appears to be impossible. For this reason, the search was directed towards those parts of the patent claims that appeared to be supported or disclosed as previously defined, namely those parts referring to the nucleic acids, methods and plants as indicated in the embodiment examples 1-12, namely DNA sequences coding for beta-amylase in sense and antisense orientation, optionally combined with DNA sequences coding for soluble starch synthase I, II and/or III in sense and antisense orientation.

The applicant's attention is drawn to the fact that patent claims, or parts of patent claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective whether or not the patent claims are amended following receipt of the International Search Report (PCT Art. 19) or whether or not the applicant files new patent claims during any PCT Chapter II procedure.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/05523

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9428149 A	08-12-1994	AU 687409 B	26-02-1998
		AU 6947394 A	20-12-1994
		CA 2162383 A	08-12-1994
		CN 1127016 A	17-07-1996
		EP 0701618 A	20-03-1996
		HU 73468 A	28-08-1996
		JP 8510645 T	12-11-1996
		PL 311755 A	18-03-1996
		US 5648249 A	15-07-1997
WO 9205259 A	02-04-1992	AT 175238 T	15-01-1999
		AU 656920 B	23-02-1995
		AU 8651491 A	15-04-1992
		CA 2072656 A	14-03-1992
		DE 69130698 D	11-02-1999
		DE 69130698 T	22-07-1999
		EP 0479359 A	08-04-1992
		JP 5502591 T	13-05-1993
		NZ 239789 A	27-06-1994
		PT 98967 A, B	31-07-1992
		US 5705375 A	06-01-1998
WO 9409144 A	28-04-1994	CA 2146998 A	28-04-1994
		AU 690517 B	30-04-1998
		AU 2696492 A	09-05-1994
		EP 0664835 A	02-08-1995

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Nacionales Abkürzungen  
PCT/EP 99/05523

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12N15/82 C12N9/26 C12N15/54 A01H5/00 C08B30/00		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N A01H C08B		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	YOSHIDA N ET AL: "A NUCLEAR GENE ENCODING BETA-AMYLASE OF SWEET POTATO" GENE, Bd. 120, Nr. 2, Seite 255-259 XP000616567 ISSN: 0378-1119 das ganze Dokument	1,3-7, 11,12,24
X	DATABASE EMPLN 'Online! EMBL, Heidelberg, Germany AC AJ225087, ID VUA225087, 23. März 1998 (1998-03-23) BHULLAR S S: "Isolation and characterization of beta-amylase from cowpea (Vigna unguiculata)" XP002124966 Zusammenfassung	1,3-7, 11,12,24
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besondere bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindeterischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindeterischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
20. Dezember 1999		11/01/2000
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Oderwald, H

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In. ztionales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05523

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MITA S ET AL.: "Sugar-inducible expression of a gene for beta-amylase in Arabidopsis thaliana" PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 107, 1995, Seiten 895-904, XP002124965 das ganze Dokument	1,3-7, 12,24
A	WO 94 28149 A (MONSANTO CO ;BARRY GERARD FRANCIS (US); KISHORE GANESH MURTHY (US)) 8. Dezember 1994 (1994-12-08) das ganze Dokument	2-4,6,7, 9-25
X	ABEL G J W ET AL.: "Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a novel 139 kDa starch synthase from potato (Solanum tuberosum L.)" PLANT JOURNAL, Bd. 10, Nr. 6, 1996, Seiten 981-991, XP002121809 das ganze Dokument	6-25
A		2-4
A	WO 92 05259 A (GIST BROCADES NV ;MOGEN INT (NL)) 2. April 1992 (1992-04-02) das ganze Dokument	1-25
A	WO 94 09144 A (ZENECA LTD) 28. April 1994 (1994-04-28) das ganze Dokument	1-25

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05523

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
**Siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210**
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## Fortsetzung von Feld I.2

Die geltenden Patentansprüche 2-4, 6, 7 und 9-25 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Nukleinsäuremoleküle, Verfahren und Pflanzen, von denen sich nur ein kleiner Anteil im Sinne von Art. 6 PCT auf die Beschreibung stützen und/oder als im Sinne von Art. 5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann. Im vorliegenden Fall fehlt den Patentansprüchen die entsprechende Stütze und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend, die Nukleinsäuren, Verfahren und Pflanzen wie sie in den Ausführungsbeispielen 1-12 angegeben sind, nämlich beta-Amylase-kodierende DNA-Sequenzen in sense und antisense Orientierung, gegebenenfalls in Kombination mit DNA Sequenzen kodierend für lösliche Stärke-Synthase I, II und/oder III in sense und antisense Orientierung.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Int. Klass. Altkennzeichen  
PCT/EP 99/05523

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9428149 A	08-12-1994	AU 687409 B	26-02-1998
		AU 6947394 A	20-12-1994
		CA 2162383 A	08-12-1994
		CN 1127016 A	17-07-1996
		EP 0701618 A	20-03-1996
		HU 73468 A	28-08-1996
		JP 8510645 T	12-11-1996
		PL 311755 A	18-03-1996
WO 9205259 A	02-04-1992	US 5648249 A	15-07-1997
		AT 175238 T	15-01-1999
		AU 656920 B	23-02-1995
		AU 8651491 A	15-04-1992
		CA 2072656 A	14-03-1992
		DE 69130698 D	11-02-1999
		DE 69130698 T	22-07-1999
		EP 0479359 A	08-04-1992
WO 9409144 A	28-04-1994	JP 5502591 T	13-05-1993
		NZ 239789 A	27-06-1994
		PT 98967 A, B	31-07-1992
		US 5705375 A	06-01-1998
		CA 2146998 A	28-04-1994
		AU 690517 B	30-04-1998
		AU 2696492 A	09-05-1994
		EP 0664835 A	02-08-1995